

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**YÜKSEK PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFİ KULLANILARAK
TETRASİKLİN ANTİBİYOTİKLERİNİN VE EPİMERLERİNİN
ANALİZİ İÇİN METODUN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU**

İlkay KONÇE

**Danışman
Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2018**



©2018 [İlkay KONÇE]

TEZ ONAYI

İlkay KONÇE tarafından hazırlanan "Yüksek Performans Sıvı Kromatografi Kullanılarak Tetrasiklin Antibiyotiklerinin ve Epimerlerinin Analizi için Metodun Geliştirilmesi ve Validasyonu" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak başarı ile savunulmuştur.

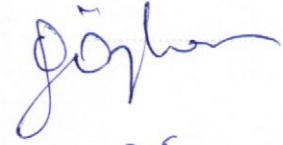
Danışman

Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Yrd. Doç. Dr. Hale SEÇİLMİŞ CANBAY
Mehmet Akif Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Yasin TUNCER

TAAHHÜTNAME

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

İlkay KONÇE



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. Antibiyotikler.....	1
1.1.1. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılmaları	1
1.1.1.1. Bakteriyostatikler	1
1.1.1.2. Bakterisidler.....	2
1.1.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılmaları	2
1.2. Tetrasiklinler	3
1.2.1. Tetrasiklinlerin Sınıflandırılması	4
1.3. Ters Faz Sıvı Kromatografi Yöntemiyle İyonlaşma Sabiti Tayini	6
1.3.1. Kromatografik Yöntemler	8
1.3.2. Sıvı Kromatografik Yöntemler.....	9
1.4. Ters Faz Sıvı Kromatografide Kullanılan Temel Kavramlar	10
1.4.1. Alıkonma Süresi	10
1.4.2. Kapasite Faktörü (Alıkonma Faktörü)	11
1.4.3. Seçicilik Katsayısı (α)	12
1.4.4. Kolon Verimliliğinin Kantitatif Tanımı	13
1.4.5. Pik Asimetrisi.....	13
1.4.6. Bir Kolonda Teorik Tabaka Sayısı.....	14
1.4.7. Ayırma Gücü (R_s).....	14
1.5. Çözünen Tanımlayıcısı Kullanılarak Alıkonma Faktörünün Tahmini.....	15
1.6. İyonlaşan Analitin Alıkonmasında Organik Modifiyerin Etkisi	16
1.7. Ters Faz Sıvı Kromatografi Yönteminde Su Ortamındaki pKa Değerlerinin Belirlenmesi	18
1.7.1. Mol kesri-pKa yöntemi.....	18
1.7.2. Solvatokromik Çözücü Parametresi (E_T^N) Kullanılarak Hesaplama Yöntemi	20
1.8. Metot Validasyonu Parametreleri.....	20
1.8.1. Güven Sınırları, Güven Aralığı Ve Güven Seviyesi	20
1.8.2. Doğruluk	20
1.8.2.1. Mutlak Bağlı ve Yüzde Bağlı Hatalar	21
1.8.3. Kesinlik.....	21
1.8.4. Standart Sapma	22
1.8.5. Seçicilik.....	22
1.8.6. Gözlenebilirlik Sınırı (LOD)	23
1.8.7. Tayin alt sınırı (LOQ)	23
1.8.8. Doğrusallık.....	24
1.9. Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemi	25
2. KAYNAK ÖZETLERİ	27
3. MATERYAL VE METOT	33
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	33

3.2. Kromatografik Çalışmalar	35
3.2.1. Kullanılan cihazlar	35
3.2.1.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı	35
3.2.1.2. pH/iyon metre	35
3.2.2. RPLC Kolon Seçimi	35
3.2.3. Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler	36
3.2.3.1. %20 (h/h) Asetonitril-su İkili Karışımı	36
3.2.3.2. %25 (h/h) Asetonitril-su İkili Karışımı	36
3.2.3.3. %30 (h/h) Asetonitril-su İkili Karışımı	37
3.2.3.4. Urasil çözeltisi	37
3.2.3.5. Potasyum hidrojen fitalat çözeltisi	37
3.3. Yöntem	38
3.3.1. Sıvı kromatografik Yöntemle Tayin	38
3.3.2. Solver (Çözücü) Kullanılarak pK _a Tayini	38
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	39
4.1. Bileşiklerin Chemicalize ile Hesaplanmış İyonlaşma Sabitleri	39
4.2. Bileşiklerin RPLC Yöntemiyle Farklı Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabitlerinin Tayini	40
4.2.1. Tetrasiklin için Sıvı Kromatografik Veriler	40
4.2.2. 4-epitetrasiklin için Sıvı Kromatografik Veriler	48
4.2.3. Klortetrasiklin için Sıvı Kromatografik Veriler	55
4.2.4. 4-epiklortetrasiklin için Sıvı Kromatografik Veriler	63
4.2.5. Oksitetrasiklin için Sıvı Kromatografik Veriler	71
4.2.6. 4-epioksitetrasiklin için Sıvı Kromatografik Veriler	78
4.3. Su Ortamındaki pK _a Değerlerinin Tayini	86
4.3.1. Mol kesri-pK _a yöntemi	86
4.3.2. Mobil Faz Solvatokromik Parametresi (E_T^N) Kullanılarak Yapılan Hesaplama	92
4.4. Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu	99
4.5. Numune Çalışması	100
4.5.1. İç Standartın Belirlenmesi	100
4.5.2. Tetrasiklin, Oksitetrasiklin ve Klortetrasiklinin Ters Faz Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Analizinde Metot Validasyonu	100
4.5.2.1. Kalibrasyon Doğrusu ve Duyarlılık	101
4.5.3. Atık Su Numunesinde Geri Kazanım Çalışması	103
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	106
KAYNAKLAR	110

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

YÜKSEK PERFORMANS SIVI KROMATOĞRAFİ KULLANILARAK TETRASİKLİN ANTİBİYOTİKLERİNİN VE EPİMERLERİNİN ANALİZİ İÇİN METODUN GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU

İlkay KONÇE

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

Tetrasiklinler mikoplazma ve klamidya gibi organizmaların yanı sıra gram pozitif ve gram negatif bakterilere karşı aktif, geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. Bu grup, yem katkı maddelerinin yanı sıra insan ve veterinerlik ilaçlarında da yaygın olarak kullanılırlar. Yüksek performans sıvı kromatografi yöntemi (HPLC) antibiyotiklerin izolasyonu ve kantitatif tayinleri için güçlü bir tekniktir. Bu ilaçların ayrılmaları ve kantitatif tayinleri biyofarmasötik ve klinik çalışmaların başarılı gerçekleştirilmeleri için önemlidir. Tetrasiklinlerde 4 halkalı bir karboksilik yapı olan hidronaftasen çekirdeği bulunur. Tetrasiklin analogları bu yapının 5., 6. veya 7. pozisyonlarındaki gruplarda farklılık gösterir. Sunulan tezde, tetrasiklin (TC), oksitetrasiklin (OTC), klortetrasiklin (CTC) ve onların epimerlerinin asit iyonlaşma sabiti (pK_a) değerlerinin tayini için HPLC-UV metot geliştirilmiştir. Çalışmada asetonitril-su ikili karışımı hidroorganik çözücü karışımı olarak seçilmiştir. pH değerleri hareketli faz olarak kullanılan hidroorganik karışımda ölçülmüştür. Bu bileşiklerin kromatografik davranışlarında iki faktörün (solvent yüzdesi ve hareketli fazın pH' sı) birleştirilmiş etkisi araştırılmıştır. Çözünen tanımlayıcısı, solvasyon parametre modeli kullanılarak farklı mobil faz pH değerlerinde çalışılan bileşiklerin alıkonmasının tahmini için kullanılmıştır. Kromatografik çalışma Kinetex F5 (2,6 μ m, 150x4.6 mm) kolonla gerçekleştirilmiştir. Sudaki pK_a değerleride Solvatokromik parametre ve mol kesri eşitliklerinin ekstrapolasyonu ile belirlenmiştir. Geliştirilen ve valide edilen metot, çalışılan bileşiklerin kantitatif analizi için başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Tetrasiklin, Epimer, Asit iyonlaşma sabiti, RPLC, Alıkonma faktörü, Metot validasyonu.

2018, 115 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DEVELOPMENT AND VALIDATION OF A METHOD FOR THE ANALYSIS OF TETRACYCLINE ANTIBIOTICS AND THEIR EPIMERS USING HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

İlkay KONÇE

Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

Tetracyclines are broad-spectrum antibiotics active against a wide range of gram-positive and gram-negative bacteria, as well as a range of organisms such as mycoplasma and chlamydia. They are widely used in human and veterinary medicines, as well as feed additives. High performance liquid chromatography method (HPLC) is a powerful tool for isolation and quantification of antibiotics. The separation and quantify of these drugs is critical for the successful conduct of biopharmaceutical and clinical studies. The basic structure of a tetracycline consists of a hydro naphthacene backbone containing four fused rings. In proposed thesis; HPLC-UV method was developed to determination of acid dissociation constant (pK_a) values of tetracycline (TC), oxtetracycline (OTC), chlortetracycline (CTC) with their 4-epimers. In this study, acetonitrile-water binary mixture was chosen as hydroorganic solvent mixture. pH values were measured in the hydroorganic mixture, which was used as the mobile phase. The combined effect of the two factors (solvent percentage and pH of the mobile phase) on the chromatographic behavior of these compounds was investigated. Solute descriptor was used for the prediction of retention of studied compounds at different mobile phase pH values using the solvation parameter model. Chromatographic study was performed with Kinetex F5 C4 column (2.6 μ m, 150x4.6 mm). Aqueous pK_a values were also estimated with extrapolation by means of the Solvatochromic parameter and mole fraction equations. The developed and validated method was successfully used for quantitative analysis of studied compounds.

Keywords: Tetracycline, Epimer, Acid ionization constant, RPLC, Retention factor, Method validation.

2018, 115 pages

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim süresince değerli bilgilerini benimle paylaşan, araştırmalarımın her aşamasında fikir ve tecrübelerinden faydalanma fırsatı veren, anlayışlı ve hoşgörülü tavrıyla yardımlarını üzerimden hiçbir zaman eksik etmeyen Süleyman Demirel Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi saygıdeğer danışman hocam Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY' a teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarım boyunca benden yardımlarını eksik etmeyen değerli laboratuvar arkadaşlarıma teşekkür ederim.

Tüm eğitim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, her anımda yanımda olup, çalışmalarımda beni cesaretlendiren sevgili aileme sonsuz teşekkürü bir borç bilirim.

4917-YL2-17 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

İlkay KONÇE
ISPARTA, 2018

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Tetrasiklinin kimyasal yapısı.....	5
Şekil 1.2. Klortetrasiklinin kimyasal yapısı	5
Şekil 1.3. Oksitetrasiklinin kimyasal yapısı	6
Şekil 1.4. Tetrasiklin ve epimerlerinin kimyasal yapısı.....	6
Şekil 1.5. Ters faz sıvı kromatografik proses	10
Şekil 1.6. HPLC kromatogramı.....	11
Şekil 1.7. Organik çözücü değişiminin kapasite faktörüne etkisi.....	12
Şekil 1.8. Seçicilikte kolon farklılığının gösterimi	13
Şekil 1.9. Kolon asimetrisi	14
Şekil 1.10. Seçicilik faktörünün ayırma gücüne etkisi.....	15
Şekil 1.11. Asidik analitin pKa değerine organik modifiyerin etkisi.....	17
Şekil 1.12. HPLC yöntemi ile kalibrasyon işlemi	24
Şekil 2.1. Tetrasiklinin deneysel ve bilgisayar programı ile hesaplanmış pKa değerleri.....	28
Şekil 4.1. Tetrasiklinin genel yapısı.....	39
Şekil 4.2. Tetrasiklin için % 30 asetonitril: su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	41
Şekil 4.3. Tetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik.....	42
Şekil 4.4. Tetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH- alıkonma zamanı ilişkisi.....	43
Şekil 4.5. Tetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	44
Şekil 4.6. Tetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 6,0-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik.....	45
Şekil 4.7. Tetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında pH- alıkonma zamanı ilişkisi.....	45
Şekil 4.8. Tetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik.....	46
Şekil 4.9. Tetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, 5,5-7,5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	47
Şekil 4.10. Tetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında pH- alıkonma zamanı ilişkisi	48
Şekil 4.11. 4-epitetrasiklin için % 30 asetonitril: su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	49
Şekil 4.12. 4-epitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	50

Şekil 4.13. 4-epitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH- alınma zamanı ilişkisi	50
Şekil 4.14. 4-epitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	51
Şekil 4.15. 4-epitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 6,0-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	52
Şekil 4.16. 4-epitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH- alınma zamanı ilişkisi	53
Şekil 4.17. 4-epitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	54
Şekil 4.18. 4-epitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, 5,5-8,0 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik.	55
Şekil 4.19. 4-epitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında pH- alınma zamanı ilişkisi	55
Şekil 4.20. Klortetrasiklin için % 30 asetonitril: su ikili karışımında, pH 2,5-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	56
Şekil 4.21. Klortetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	57
Şekil 4.22. Klortetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH- alınma zamanı ilişkisi	58
Şekil 4.23. Klortetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 2,5-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	59
Şekil 4.24. Kloretrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	60
Şekil 4.25. Klortetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında pH- alınma zamanı ilişkisi	60
Şekil 4.26. Klortetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, pH 2,5-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	61
Şekil 4.27. Klortetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, 5,5-8,0 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	62
Şekil 4.28. Klortetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında pH- alınma zamanı ilişkisi	63
Şekil 4.29. 4-epiklortetrasiklin için % 30 asetonitril: su ikili karışımında, pH 2,5- 5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	64
Şekil 4.30. 4-epiklortetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5- 8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	65

Şekil 4.31. 4-epiklortetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH- alınma zamanı ilişkisi	65
Şekil 4.32. 4-epiklortetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 2,5- 5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	66
Şekil 4.33. 4-epiklortetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5- 8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	67
Şekil 4.34. 4-epiklortetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında pH- alınma zamanı ilişkisi	68
Şekil 4.35. 4-epiklortetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, pH 2,5- 5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	69
Şekil 4.36. 4-epiklortetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, 5,5-8,0 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	70
Şekil 4.37. 4-epiklortetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında pH- alınma zamanı ilişkisi	70
Şekil 4.38. Oksitetrasiklin için % 30 asetonitril: su ikili karışımında, pH 3,0-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	71
Şekil 4.39. Oksitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	72
Şekil 4.40. Oksitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH- alınma zamanı ilişkisi	73
Şekil 4.41. Oksitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3,0-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	74
Şekil 4.42. Oksitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 6,0-8,0 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	75
Şekil 4.43. Oksitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında pH- alınma zamanı ilişkisi	75
Şekil 4.44. Oksitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3,0-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	76
Şekil 4.45. Oksitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	77
Şekil 4.46. Oksitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında pH- alınma zamanı ilişkisi	78
Şekil 4.47. 4-epioksitetrasiklin için % 30 asetonitril: su ikili karışımında, pH 3,0- 5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	79
Şekil 4.48. 4-epioksitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5- 8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	80

Şekil 4.49. 4-epioksitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH-alıkonma zamanı ilişkisi	81
Şekil 4.50. 4-epioksitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3,0-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	82
Şekil 4.51. 4-epioksitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	83
Şekil 4.52. 4-epioksitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında pH-alıkonma zamanı ilişkisi	83
Şekil 4.53. 4-epioksitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3,0-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	84
Şekil 4.54. 4-epioksitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, 5,5-8,0 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik	85
Şekil 4.55. 4-epioksitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında pH-alıkonma zamanı ilişkisi	86
Şekil 4.56. Tetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa ₁ değerinin hesaplanması	86
Şekil 4.57. Tetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa ₂ değerinin hesaplanması	87
Şekil 4.58. 4-epitetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa ₁ değerinin hesaplanması	87
Şekil 4.59. 4-epitetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa ₂ değerinin hesaplanması	88
Şekil 4.60. Klortetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa ₁ değerinin hesaplanması	88
Şekil 4.61. Klortetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa ₂ değerinin hesaplanması	89
Şekil 4.62. 4-epiklortetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa ₁ değerinin hesaplanması	89
Şekil 4.63. 4-epiklortetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa ₂ değerinin hesaplanması	90
Şekil 4.64. Oksitetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa ₁ değerinin hesaplanması	90
Şekil 4.65. Oksitetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa ₂ değerinin hesaplanması	91
Şekil 4.66. 4-epioksitetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa ₁ değerinin hesaplanması	91
Şekil 4.67. 4-epioksitetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa ₂ değerinin hesaplanması	92
Şekil 4.68. Tetrasiklinin E_T^N -pKa ₁ ilişkisi kullanılarak sudaki pKa ₁ değerinin hesaplanması	92
Şekil 4.69. Tetrasiklinin E_T^N -pKa ₂ ilişkisi kullanılarak sudaki pKa ₂ değerinin hesaplanması	93
Şekil 4.70. 4-epitetrasiklinin E_T^N -pKa ₁ ilişkisi kullanılarak sudaki pKa ₁ değerinin hesaplanması	93

Şekil 4.71. 4-epitetrasiklinin E_T^N -pKa ₂ ilişkisi kullanılarak sudaki pKa ₂ değerinin hesaplanması	94
Şekil 4.72. Klortetrasiklinin E_T^N -pKa ₁ ilişkisi kullanılarak sudaki pKa ₁ değerinin hesaplanması	94
Şekil 4.73. Klortetrasiklinin E_T^N -pKa ₂ ilişkisi kullanılarak sudaki pKa ₂ değerinin hesaplanması	95
Şekil 4.74. 4-epiklortetrasiklinin E_T^N -pKa ₁ ilişkisi kullanılarak sudaki pKa ₁ değerinin hesaplanması	96
Şekil 4.75. 4-epiklortetrasiklinin E_T^N -pKa ₂ ilişkisi kullanılarak sudaki pKa ₂ değerinin hesaplanması	96
Şekil 4.76. Oksitetrasiklinin E_T^N -pKa ₁ ilişkisi kullanılarak sudaki pKa ₁ değerinin hesaplanması	97
Şekil 4.77. Oksitetrasiklinin E_T^N -pKa ₂ ilişkisi kullanılarak sudaki pKa ₂ değerinin hesaplanması	97
Şekil 4.78. 4-epioksitetrasiklinin E_T^N -pKa ₁ ilişkisi kullanılarak sudaki pKa ₁ değerinin hesaplanması	98
Şekil 4.79. 4-epioksitetrasiklinin E_T^N -pKa ₂ ilişkisi kullanılarak sudaki pKa ₂ değerinin hesaplanması	98
Şekil 4.80. Standart karışım kromatogramı A) 1. Pravastatin (33 µg/mL); 2. Losartan (I.S.) (33 µg/mL); 3. Atorvastatin (33 µg/mL), B) 1. Rosuvastatin (50 µg/mL); 2. Losartan (I.S.) (50 µg/mL)	100
Şekil 4.81. Oksitetrasiklinin analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu	102
Şekil 4.82. Tetrasiklinin analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu	102
Şekil 4.83. Klortetrasiklinin analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu	102
Şekil 4.84. Oasis HLB katı faz kartuşuna uygulanan numunenin kromatogramı	103
Şekil 4.85. Süpelco katı faz kartuşuna uygulanan numunenin kromatogramı	103
Şekil 4.86. Oasis HLB katı faz kartuşuna uygulanan numunenin kromatogramı 1- Oksitetrasiklin 3 ppm; 2- Tetrasiklin 4 ppm; 3- Flukonazol (IS) 0,5 ppm; 4- Klortetrasiklin 4 ppm	104
Şekil 4.87. Süpelco katı faz kartuşuna uygulanan numunenin kromatogramı 1- Oksitetrasiklin 3 ppm; 2- Tetrasiklin 4 ppm; 3- Flukonazol (IS) 0,5 ppm; 4- Klortetrasiklin 4 ppm	105

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Tetrasiklin ve epimerlerinin kimyasal formülleri.....	6
Çizelge 1.2. Ters faz sıvı kromatografide yaygın kullanılan çözücülerin solvatokromik ve fizikokimyasal özellikleri.....	17
Çizelge 1.3. 25 °C' de metanol-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler....	19
Çizelge 1.4. 25 °C' de asetonitril-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler	19
Çizelge 1.5. 25 °C' de tetrahidrofuran-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler.....	19
Çizelge 3.1. Çalışılan bileşikler ve özellikleri.....	33
Çizelge 3.2. Çalışılan bileşikler ve özellikleri (Devam)	34
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	34
Çizelge 4.1. Tetrasiklin ve epimerlerinin Chemicalize ile hesaplanmış tahmini pK _a değerleri.....	40
Çizelge 4.2. Tetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	41
Çizelge 4.3. Tetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	42
Çizelge 4.4. Tetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	43
Çizelge 4.5. Tetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 6,0-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	44
Çizelge 4.6. Tetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	46
Çizelge 4.7. Tetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-7,5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	47
Çizelge 4.8. 4-epitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	48
Çizelge 4.9. 4-epitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	49
Çizelge 4.10. 4-epitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	51
Çizelge 4.11. 4-epitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 6,0-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri..	52
Çizelge 4.12. 4-epitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	53
Çizelge 4.13. 4-epitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri..	54
Çizelge 4.14. Klortetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri..	56
Çizelge 4.15. Klortetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri..	57
Çizelge 4.16. Klortetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri..	58
Çizelge 4.17. Klortetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri..	59
Çizelge 4.18. Klortetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri..	61

Çizelge 4.19. Klortetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8,0 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	62
Çizelge 4.20. 4-epiklortetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	63
Çizelge 4.21. 4-epiklortetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	64
Çizelge 4.22. 4-epiklortetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	66
Çizelge 4.23. 4-epiklortetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	67
Çizelge 4.24. 4-epiklortetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	68
Çizelge 4.25. 4-epiklortetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8,0 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	69
Çizelge 4.26. Oksitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 3,0-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri..	71
Çizelge 4.27. Oksitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri..	72
Çizelge 4.28. Oksitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3,0-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri..	73
Çizelge 4.29. Oksitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 6,0-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri..	74
Çizelge 4.30. Oksitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3,0-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri..	76
Çizelge 4.31. Oksitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8,0 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	77
Çizelge 4.32. 4-epioksitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 3,0-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	78
Çizelge 4.33. 4-epioksitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	79
Çizelge 4.34. 4-epioksitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3,0-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	81
Çizelge 4.35. 4-epioksitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	82
Çizelge 4.36. 4-epioksitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3,0-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri	84

Çizelge 4.37. 4-epioksitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8,0 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	85
Çizelge 4.38. Bileşiklerin analizine ait kalibrasyon fonksiyonu özellikleri.....	101
Çizelge 4.39. Katkılandırılmış bileşikleri içeren atık su numunesinin % geri kazanım sonuçları	104
Çizelge 5.1. Solver programı ile hesaplanan pKa ₁ ve pKa ₂ değerleri.....	106
Çizelge 5.2. Su ortamındaki pKa hesaplamaları.....	108



1. GİRİŞ

1.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler, antibakteriyel ilaçlar içinde çok önemli bir yere sahiptir. Hem insanların tedavisinde, hem de veterinerlikte kullanımı günden güne artan ve aktif biyolojik moleküller olan antibiyotikler, çok hafif rahatsızlıklardan hayati tehlike ihtiva eden enfeksiyonlara kadar birçok hastalığın tedavisinde kullanılmaktadır. Bakteriyostatik (engelleyici) ve bakterisidal (öldürücü) etkiye sahip olan antibiyotikler, DNA, proteinler veya hücre duvarı bileşenlerinin biyosentezine zarar veren bakterileri etkisiz hale getirir ya da onları yok eder (Yu vd.,2012).

1.1.1. Antibiyotiklerin Etki Güçlerine Göre Sınıflandırılmaları

Vücut sıvılarında oluşturdukları konsantrasyonlarda, mikroorganizmalar üzerindeki etki derecelerine göre ikiye ayrılırlar (Akkan, 1997).

1.1.1.1. Bakteriyostatikler

Bunlar bakteri hücrelerinin gelişmesini ya da üremesini önlerler. Gelişmesi ve üremesi duran bakteriler, vücudun savunma mekanizmaları tarafından kolaylıkla yok edilirler. Bakteriyostatik etki gücünün göstergesi “Minimum İnhibitör Konsantrasyon = MİK” dur. Başlıca bakteriyostatikler:

- Tetrasiklinler
- Makrolitler
- Sülfonamidler
- Amfenikoller
- Linkozamidler
- Metronidazol
- Mikonazol

1.1.1.2.Bakterisidler

Bunlar bakteri hücrelerini doğrudan yok ederler. Bakterisid etki gücünün göstergesi “Minimum Bakterisid Konsantrasyon = MBK” dur.

- Beta-Laktamlar
 - a. Penisilinler
 - b. Sefalosporinler
 - c. Monobaktamlar
 - d. Karbapenemler
 - e. Polipeptidler
 - f. Florokinolonlar
 - g. Vankomisin
 - h. Rifamisin
 - i. Teikoplanin
- Beta-Laktamaz İnhibitörleri
 - a. Sulbaktam
 - b. Tazobaktam
 - c. Klavulanik Asit

1.1.2. Antibiyotiklerin Etki Mekanizmalarına Göre Sınıflandırılmaları

Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre 5'e ayrılırlar (Akkan, 1997).

I. Bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive edenler

- Beta-Laktamlar (penisilinler, sefalosporinler, monobaktamlar, karbapenemler, sikloserin, ristosetin, basitrasin, teikoplanin, vankomisin).

II. Sitoplazma membranpermeabilitesini bozanlar

- Polimiksinler, gramisidin, nistatin, amfoterisin B, kandisein, ketokonazol ve diğer antifungalimidazoller, flukonazol ve diğer antifungaltrizoller, heksaklorofen, katyonik deterjanlar.

III. Ribozomlarda protein sentezini bozanlar

- Tetrasiklinler, aminoglikozidler, makrolitler, amfenikoller, linkozamidler, füsidik asit.

IV. Bakteri genetik materyali üzerine etki yapanlar

- Florokinolonlar, rifamisinler, nalidiksik asit, metronidazol, aktinomisinler, mitomisinler, bleomisin, asiklovir, doksorubisin, daunorubisin, metotreksat.

V. Bakteriyel antimetabolitler

- Sülfonamidler, sülfonlar, PAS, izoniazid (INH), trimetoprim, etambutol.

1.2. Tetrasiklinler

Başlıca bakteriyostatiklerden olan tetrasiklinler, yapıcı birbirine çok benzeyen ve tetrasiklik bir bileşik olan naftasenkarboksamid'den türeyen geniş spektrumlu antibiyotiklerdir. İlk tetrasiklin antibiyotik, 1948 yılında *Streptomyces aureofaciens*'ten elde edilen klortetrasiklin'dir. Daha sonra oksitetrasiklin, tetrasiklin ve demetilklortetrasiklin isimli diğer doğal tetrasiklinler tedavide kullanılmaya başlamışlardır. Bunları yarı sentetik tetrasiklinler olan metasiklin, doksisisiklin ve minosiklin izlemiştir. En fazla kullanılanlar oksitetrasiklin, tetrasiklin ve doksisisiklin'dir. Tetrasiklin antibiyotikler, antibakteriyel spektrumları bakımından genellikle benzer yapıdadırlar, ama belirli bir mikroorganizma türüne karşı etki güçleri bakımından az da olsa farklılık gösterebilirler (Kayaalp, 2005).

Tetrasiklinler, dayanıklılığı ve düşük maliyetinden dolayı, insanların tedavisi ve hayvancılıkta geniş bir kullanım yerine sahiptir. Bununla birlikte genelde belirgin yan etkileri olmamasına rağmen tetrasiklinler, mide-bağırsak sisteminde, cilt ve merkezi sinir sisteminde olumsuz etkiler gösterebilmektedir (Brüning vd., 2014).

Tetrasiklinler; süt ve süt ürünleri, kalsiyum, magnezyum, alüminyum hidroksitle birlikte alındığında emilimi bozulur. Ayrıca, tetrasiklinler kullanım süresi dolduktan sonra kullanılmaları halinde zehirlenmeye yol açabilirler. Tetrasiklinler zamanla toksik olma özelliğine sahip nadir antibiyotiklerdendir. Bu nedenle kullanım süresi dolduktan sonra kullanılırsa, özellikle böbreklere zarar verebilirler.

Oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin ve doksisiklin dahil olmak üzere tetrasiklinler hayvan yetiştiriciliğinde önemli bir ilaç grubudur (Zheng vd., 2012).

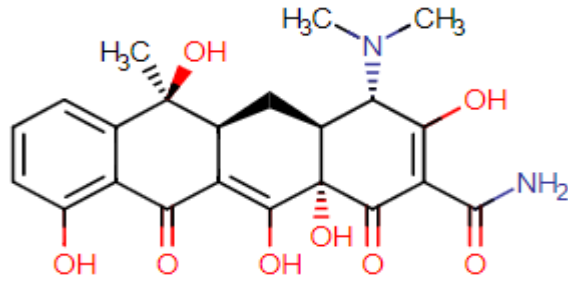
1.2.1. Tetrasiklinlerin Sınıflandırılması

Tetrasiklinler kimyasal olarak bir karboksiamid işlevsel gruba sahip, kısmen konjüge edilmiş dört halka yapısı ile karakterizedir. Oksitetrasiklin, tetrasiklin, klortetrasiklin, minosiklin, metasiklin, demeklosiklin ve doksisiklin bu antibiyotik sınıfının temsilcisidir (Yu vd., 2011).

Tetrasiklinlerin aralarında farmakokinetik yönünden ciddi farklar vardır. Bundan dolayı;

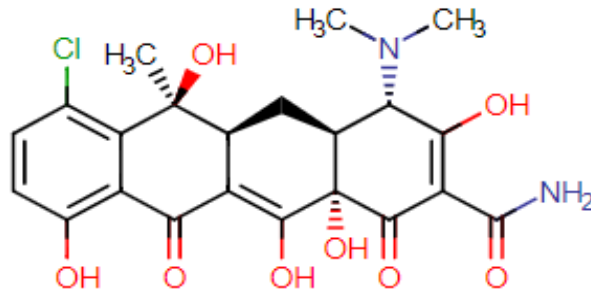
1. Kısa süre etkili (tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin)
 2. Orta süre etkili (demeklosiklin ve metasiklin)
 3. Uzun süre etkili (doksisiklin ve minosiklin)
- olmak üzere üçe ayrılırlar.

Tetrasiklinlerin yapısında 5 veya 6 kiral merkezi vardır (Şekil 1.1).



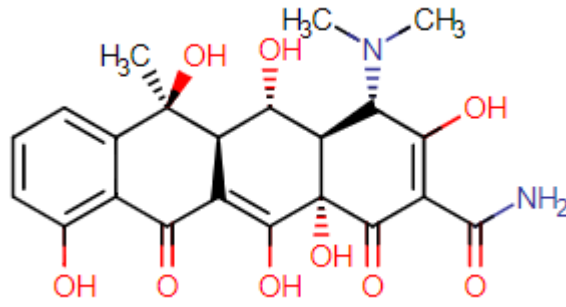
Şekil 1.1. Tetrasiklinin kimyasal yapısı

Tetrasiklin ailesinin ilk üyesi olan klortetrasiklin (Şekil 1.2), veterinerlik uygulamasında bakteriyel enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan geniş spektrumlu bir antibiyotiktir. Klortetrasiklin, hücre duvarı inhibitörü antibakteriyel etkenlere dirençli olan bazı mikroorganizmalara karşı aerobik ve anaerobik gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı da aktiftir. Klortetrasiklin duyarlı bakterilerin hücrelerine aktif olarak taşınır ve 30S ribozom alt parçacıklarına bağlandıktan sonra protein biyosentezini engelleyerek etkilemektedir. Klortetrasiklin ayrıca domuz, kümes hayvanları ve diğer çiftlik hayvanlarının tedavisinde de etkilidir (Posyniak vd., 2005).



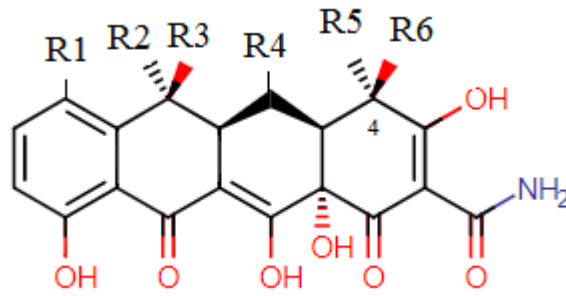
Şekil 1.2. Klortetrasiklinin kimyasal yapısı

Oksitetrasiklin (Şekil 1.3), geniş spektrumlu antimikrobik etkinlik ve düşük maliyet nedeniyle gelişmekte olan ülkelerde tedavi amaçlı olarak sıklıkla kullanılır (Shi vd., 2017).



Şekil 1.3. Oksitetrasiklinin kimyasal yapısı

Tetrasiklinler oldukça karasız polar bileşiklerdir. Asidik ve bazik ortamlarda epimerlerine dönüşürler (Şekil 1.4). Bileşiklerin epimerine dönüşümlerinde sadece 4 numaralı karbon üzerindeki amonyum katyonu ile hidrojenin yerdeğişimi olmaktadır. Tetrasiklin ve epimerlerinin kimyasal formülleri Çizelge 1.1’ de gösterilmiştir.



Şekil 1.4. Tetrasiklin ve epimerlerinin kimyasal yapısı

Çizelge 1.1. Tetrasiklin ve epimerlerinin kimyasal formülleri

	R1	R2	R3	R4	R5	R6
Tetrasiklin	H	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H
4-epitetrasiklin	H	CH ₃	OH	H	H	N(CH ₃) ₂
Oksitetrasiklin	H	CH ₃	OH	OH	N(CH ₃) ₂	H
4-epioksitetrasiklin	H	CH ₃	OH	OH	H	N(CH ₃) ₂
Klortetrasiklin	Cl	CH ₃	OH	H	N(CH ₃) ₂	H
4-epiklortetrasiklin	Cl	CH ₃	OH	H	H	N(CH ₃) ₂

1.3. Ters Faz Sıvı Kromatografi Yöntemiyle İyonlaşma Sabiti Tayini

İyonlaşma sabiti (pK_a) tayini birçok bilimsel alanda, özellikle de eczacılıkta büyük öneme sahiptir. İlaç bileşiklerinin lipofilitesi, çözünürlüğü ve

geçirgenliği pK_a ' ya bağımlıdır. İlaç geliştirme prosesinde pK_a hakkında doğru bilgi sahibi olmak oldukça önemlidir. Bunun yanı sıra biyolojik sistemlerde bir bileşiğin absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılımını (ADME) tahmini ve kantitatif yapı alıkonma ilişkilerinin belirlenmesi için pK_a gereklidir. Suda çözünmesi yeterli olmayan veya su ortamında iyonlaşma sabitleri tayin edilmeyen bileşikler su-organik çözücü ikili karışımlarında kolaylıkla tayin edilebilirler (Kazakevich ve Lobrutto, 2007; Narasimham ve Barhate, 2011). Bu parametrenin belirlenmesinde potansiyometrik ve kondüktometrik titrasyonlar, spektrofotometrik yöntemler, kapiler elektroforez ve sıvı kromatografi yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır (Barbosa vd., 2001; Demiralay vd., 2009; Sanlı vd., 2009; Demiralay vd., 2010; Canbay vd., 2011, Demiralay vd., 2012).

Sıvı kromatografide iyonlaşan çözünen için kromatografik alıkonmanın (t_R) mobil faz pH' sının bağımlılığı teorik olarak ilk Horvath ve Melander tarafından önerilmiştir (Horvath vd., 1977).

Zayıf monoprotik bir asit için alıkonma faktörünün değişimini gösteren bu eşitlikte,

$$t_R = \frac{t_{RHA} + t_{RA^-} \frac{K_a}{a_{H_m^+} \gamma_{A_m^-}}}{1 + \frac{K_a}{a_{H_m^+} \gamma_{A_m^-}}} \quad (1.1)$$

K_a : Zayıf asidin iyonlaşma sabiti

$\gamma_{A_m^-}$: Debye-Hückel eşitliği tarafından hesaplanan mobil fazdaki iyonlaşan asidin aktivite katsayısı

t_{RHA} : İyonlaşmamış zayıf asidin kapasite faktörü

t_{RA^-} : İyonlaşmış zayıf asidin kapasite faktörü

$a_{H_m^+}$: Mobil fazdaki hidrojen iyonu aktivitesi

Bu bağıntıdan görüldüğü gibi iyonlaşan bileşiğin alıkonma zamanını etkileyen 3 etken vardır. Bunlar, moleküler türün ve iyonik türün alıkonma zamanı ve bileşiğin iyonlaşma sabitidir. Bu üç deneysel değer de organik modifiyerin

derişimine bağlı değerlerdir. Bu bağıntı, herhangi bir iyonlaşan bileşikte organik modifiyerin belli derişimi için iyonlaşma sabiti değeri ve su-organik çözücü ikili karışımının hidronyum derişimi biliniyorsa, bize teorik alıkonma zamanı değerlerini hesaplama imkânı sağlar.

Bir bileşiğin pK_a tayini sıvı kromatografik yöntemle yapılmak istendiğinde mobil fazın bileşimi sabit tutulur. Farklı pH değerlerinde mobil fazın hazırlanması ve her bir pH koşulu için üçer enjeksiyonla alıkonma zamanlarının belirlenmesi gerekir. Bu tip tayinde $pK_a \pm 2$ aralığında farklı pH değerlerinde alıkonma zamanları belirlenir. Absis ekseninde pH' lar, y ekseninde alıkonma zamanı kullanılarak hazırlanan sigmoidallerin dönüm noktası bileşiğin iyonlaşma sabitini verir.

1.3.1. Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, karışımıldaki kimyasal bileşiklerin ayrılması, tanınması ve tayini için kullanılan bir analitik metottur. Bütün kromatografik ayırmalarda numune, gaz veya sıvı olan hareketli faz ile taşınır. Tüm kromatografik uygulamalarda “sabit faz” ve “durgun faz” kavramları vardır. Bir kolon veya düz bir yüzeyde tutturulmuş faza durgun faz; durgun faz üzerinden veya arasından geçen ve analiti içeren faza hareketli faz adı verilir. Karışımıldaki bileşenler, akış halindeki hareketli fazla durgun faz üzerinden geçirilir; kromatografik ayırma, bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak geręekleşir. Durgun faz tarafından kuvvetli tutulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşın durgun faz tarafından zayıfça tutulan bileşenler hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri birbirinden kalitatif ve kantitatif olarak analizlenebilen farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar. Kromatografik yöntemler iki şekilde sınıflandırılabilir. Kolon kromatografide, durgun faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz basınç altında bu durgun faz arasından geğmeye zorlanır. Düzlemsel kromatografide, durgun faz düz bir plaka üzerine veya bir kâğıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz durgun fazarasından kapiler etkisiyle veya yerçekimi etkisiyle hareket eder. Kromatografinin daha temel sınıflandırması kullanılan durgun faz ve hareketli fazların tipleri ve fazlar

arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinslerine göre yapılır (Kazakevich ve Lobrutto, 2007).

Kolon Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

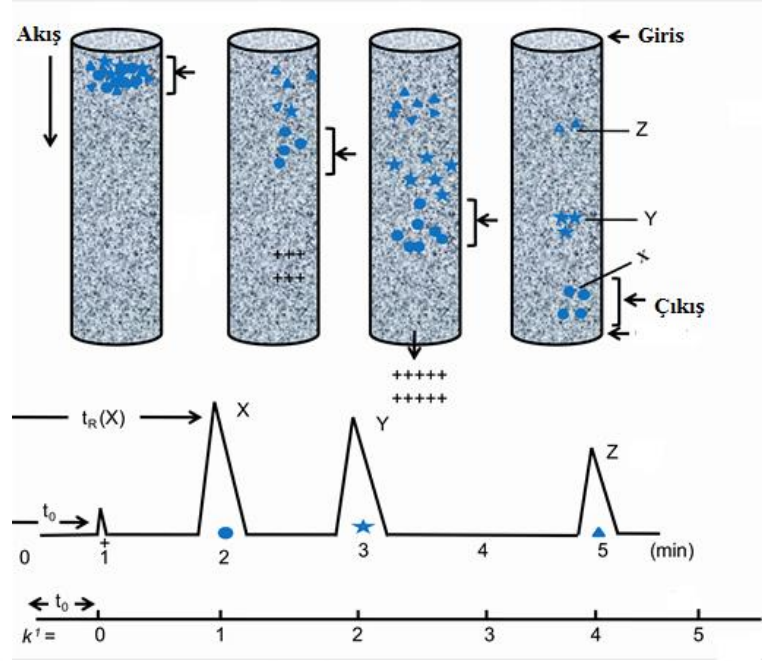
- Sıvı Kromatografi (LC) hareketli faz: sıvı
- Gaz Kromatografi (GC) hareketli faz: gaz
- Süperkritik akışkanlı kromatografi (SFC) hareketli faz: süper kritik sıvı

1.3.2. Sıvı Kromatografik Yöntemler

Sıvı kromatografik yöntemler nötral, asidik ve bazik özellikteki bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizleri için yaygın olarak kullanılan bir analitik tekniktir. Yüksek performans sıvı kromatografide (HPLC), hareketli faz, sıvı; durgun faz, çok küçük boyutta katı parçacıklardan oluşur. Bu kromatografi türü, verilen bir numunedeki bileşenlerin hızla ayırımına, ayrıca uçucu olmayan veya sıcaklıkla bozulan ve bu nedenlerle gaz kromatografik tayinleri zorlukla gerçekleştirilen maddelerin ayırımına da imkân tanır. Bunun yanı sıra asitlerin ve bazların iyonlaşma sabitlerinin (pK_a) tayininde sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek performans sıvı kromatografisi, durgun faz ve hareketli fazın bağıl polaritelerine göre iki tiptir.

- Normal faz sıvı kromatografisinde durgun faz polar, hareketli faz apolardır.
- Ters faz sıvı kromatografisinde durgun faz apolar, hareketli faz polardır.

Bu yöntemde az miktarda bileşiğe ihtiyaç duyulmaktadır yani çözünübilirlik önemli bir sorun teşkil etmemektedir ve bileşiğin saf olmasına gerek yoktur. Tayini yapılan bileşiklerdeki safsızlıkların belirlenebilmesi ve bu safsızlıkların hata getirmemesi gibi avantajlarından dolayı sıklıkla kullanılır. Bu yöntemde sıklıkla su-organik çözücü ikili karışımında tayinler yapılmaktadır. HPLC yöntemiyle bileşiklerin ayırımı sabit faz ve mobil fazla analit moleküllerinin etkileşimini temel alır (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Ters faz sıvı kromatografik proses

Sıvı kromatografik yöntemle iyonlaşma sabitlerinin tayininde bileşiğin $pK_a \pm 2$ değerleri dikkate alınarak mobil fazın pH değerleri belirlenir ve pH'ı belli mobil fazlar kullanılarak alıkonma zamanları belirlenir. Alıkonma zamanının pH ile değişimi grafiğe geçirildiğinde sigmoidal davranış gözlenir. Bu sigmoidalin orta noktasındaki pH değeri, o bileşiğin çalışılan ortamdaki iyonlaşma sabitini verir. Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin tayininde sıvı kromatografik yöntemle hesaplama yapabilen non-lineer regresyon programları da geliştirilmiştir (NLREG Version 4.0).

1.4. Ters Faz Sıvı Kromatografide Kullanılan Temel Kavramlar

RPLC yöntemiyle tayini yapılan analitlerin hem kalitatif hem de kantitatif belirlenebilmesi için kullanılan terimler aşağıda verilmiştir (Skoog vd., 2011).

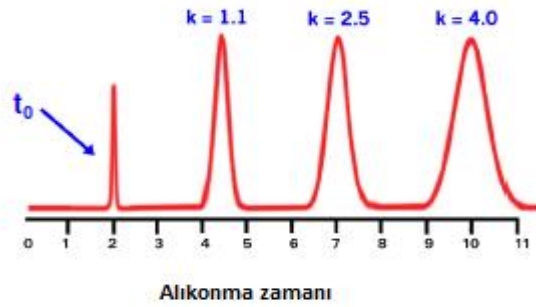
1.4.1. Alıkonma Süresi

Numune enjeksiyonundan sonra kolonda tutunmayan türe ait pik süresi ölü zaman (t_0) olarak adlandırılır ve analit piklerinin tanınmasında önemli rol oynar. t_0 , ölü zaman olarak tanımlanır ve hareketli fazın ortalama göç hızını

verir. t_0 belirleyici olarak organik çözücü veya iyonlaşan bileşenlerle çalışmada KBr, urasil veya NaNO_3 gibi tuzların sudaki çözeltileri kullanılır. Bu değerin yeterli doğrulukta belirlenmesi kapasite faktörlerinin hesaplanmasında son derece önemlidir. Numunenin enjeksiyonu ile bu pikin dedektöre ulaşması için geçen süreye alıkonma süresi denir ve t_R simgesiyle gösterilir (Skoog vd., 2011).

1.4.2. Kapasite Faktörü (Alıkonma Faktörü)

Kapasite faktörü (k) önemli bir deneysel parametre olup, tayin edilen analitlerin kolonda göç hızlarını tanımlamakta yaygın olarak kullanılır. Aynı zamanda bu nicelik hareketli faz ve sabit faz arasındaki afiniteyi de göstermektedir (Şekil 1.6).



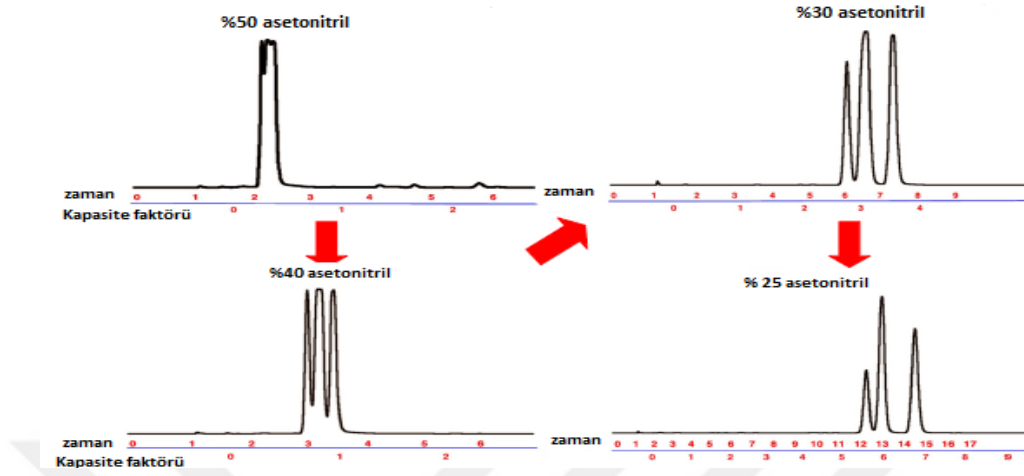
Şekil 1.6. HPLC kromatogramı

Bu parametre aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1.2)$$

Bir çözünen madde için alıkonma faktörü birden çok küçük ise, elüsyon o kadar hızlı olur ki; alıkonma süresinin doğru tayini zorlaşır. Öte yandan alıkonma faktörü 20-30 gibi bir sayıdan daha büyük ise, elüsyon süreleri gereksiz şekilde uzar. Karışımdaki çözünenler için alıkonma faktörlerinin 1 ile 5 arasında olmasını sağlayan şartlarda ayırmalar en ideal şekilde yapılır (Skoog vd., 2011).

Çalışılan herhangi bir analit için kapasite faktörü değeri daha çok mobil fazdaki organik çözücünün (metanol, asetonitril, tetrahidrofuran) yüzdesinin değiştirilmesiyle istenilen değere getirilir (Şekil 1.7).



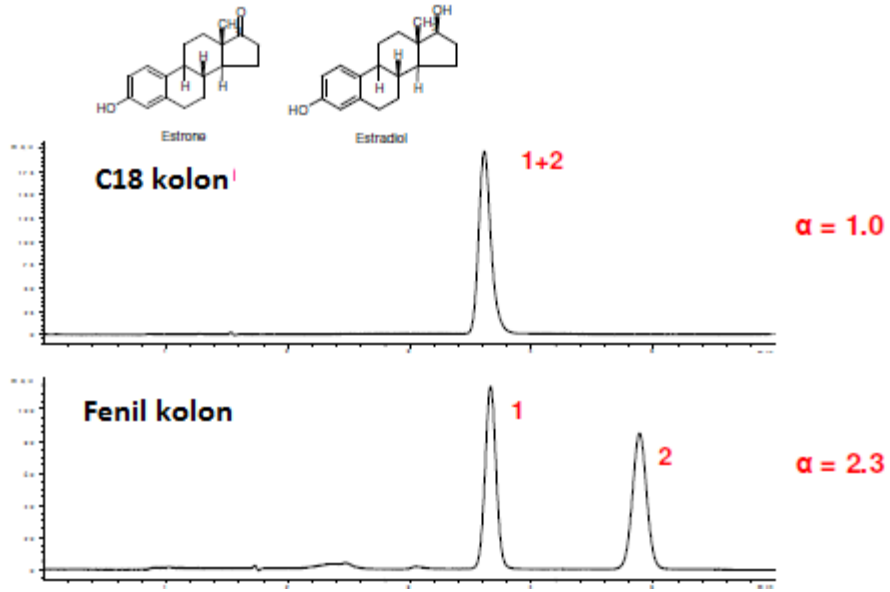
Şekil 1.7. Organik çözücü değişiminin kapasite faktörüne etkisi

1.4.3. Seçicilik Katsayısı (α)

A ve B gibi iki çözünen için bir kolonun seçicilik katsayısı

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{t_{R_B} - t_{R_0}}{t_{R_A} - t_{R_0}} \quad (1.3)$$

şeklinde tanımlanır. Burada k_B daha kuvvetli tutunan B türü için dağılma katsayısı; k_A ise, daha az kuvvetle tutunan veya daha hızlı olarak kolondan elue edilen A türü için ise aynı sabittir. Bu tanıma göre α daima birden büyüktür. α , 1,15 ise iki bileşiğin % 98 oranında birbirinden ayrıldığı kabul edilir (Poole ve Poole, 1991). Sabit fazın seçiminde analitin seçiciliği ayırmayı belirgin bir şekilde etkiler (Şekil 1.8).



Şekil 1.8. Seçicilikte kolon farklılığının gösterimi

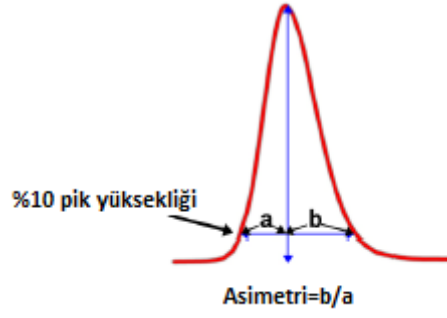
1.4.4. Kolon Verimliliğinin Kantitatif Tanımı

Kromatografik kolon verimliliklerinin nicel ölçümünde birbiriyle bağıntılı iki terim sıkça kullanılır: (1) tabaka yüksekliği (H) ve (2) teorik tabaka sayısı (N). Bu iki terim arasındaki bağıntı ($H=L/N$) kolon verimliliğini anlatmada sıklıkla kullanılır.

L, kolon dolgusunun uzunluğudur. Bir kolonda, tabakaların sayısının artması (N) ve tabaka yüksekliğinin (H) azalmasıyla verimlilik artar. Türlerine ve içerdikleri hareketli ve durgun fazların çeşitlerine bağlı olarak kolonlardaki verimlilik büyük farklılıklar gösterebilir.

1.4.5. Pik Asimetrisi

Bir pik için asimetri değeri eniyi pik şekli değerinin belirlenmesi için ölçülen bir niceliktir. Pikin asimetri değeri 1 den büyük olursa pik önden kuyruklanma, bu değer 1' den küçük olursa arkadan kuyruklanma yapar (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Kolon asimetrisi

1.4.6. Bir Kolonda Teorik Tabaka Sayısı

Bir kromatogramdan teorik tabaka sayısı (N) değeri aşağıdaki bağıntı kullanılarak bulunur:

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad (1.4)$$

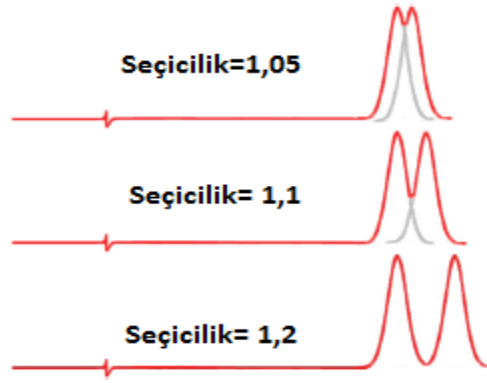
Burada t_R , bir pik için alıkonma süresi ve $W_{0,5}$, pik yarı yüksekliğindeki pik genişliği (zaman birimiyle) dir (Poole ve Poole, 1991).

1.4.7. Ayırma Gücü (R_s)

Birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücü, R_s , için farklı bağıntılar geliştirilmiştir. Aşağıdaki bağıntı kullanılarak ayırma gücü hesaplanabilir.

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left[\frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \right] \left[\frac{k_2}{(1 + k_2)} \right] \quad (1.5)$$

Bir kromatografik ayırmada en az ayrılan pikler, kritik pik çifti olarak adlandırılır. Pik çiftinin temel çizgide birbirinden ayrılabilmesi için ayırma faktörünün en az 1,5 olması istenir. Ayırma gücü, 1'den küçük olduğunda yeterli ayırım olmamaktadır (Poole ve Poole, 1991). Ayrıca bir ayırmada seçicilik faktöründeki değişim ayırma gücünü büyük oranda etkiler (Şekil 1.10)



Şekil 1.10. Seçicilik faktörünün ayırma gücüne etkisi

1.5. Çözünen Tanımlayıcısı Kullanılarak Alıkonma Faktörünün Tahmini

Ters faz sıvı kromatografi (RPLC) yönteminde çözünenin alıkonması nın belirlenmesi birçok faktöre bağımlı (sabit faz, organik modifiyerin tipi, mobil faz bileşimi ve pH'sı, kolon sıcaklığı) çok kompleks bir işlemdir. RPLC' de çözünenin alıkonmasının tahmin edilmesi için birçok model önerilmiştir. Bu modellerden birisi olan lineer solvasyon enerji bağıntısı (LSER) ile nötral, asidik, bazık ve amfiprotik bileşiklerin alıkonma faktörlerini tahmin etmek mümkündür. Bunun için çözünen tanımlayıcısı olarak çoğunlukla çözünenin iyonlaşma derecesi (D) kullanılmaktadır. D, mobil fazın pH' sına bağımlı bir sabittir (Roses vd., 1998).

Zayıf bir asit (HA) için iyonlaşma aşağıdaki gibi gösterilir (Eşitlik 1.6):



D, asidin mobil faz pH' sı ve pK_a değerine bağımlı olarak hesaplanabilir (Eşitlik 1.7 ve 1.8).

$$D = [A^-]/[HA] + [A^-] = K_a/[H_3O^+] + K_a \quad (1.7)$$

$$D = 10^{(pH-pK_a)}/[1 + 10^{(pH-pK_a)}] \quad (1.8)$$

Zayıf asit için deneysel olarak tayin edilen alıkonma zamanı (t_R) nötral (t_{RHA}) ve iyonik (t_{RA-}) türlerin alıkonma zamanı ve her bir tür için hesaplanmış mobil faz pH' sına bağımlı D ile hesaplanabilir (Eşitlik 1.9).

$$t_R = (1 - D)t_{RHA} + Dt_{RA-} \quad (1.9)$$

Eşitlik 1.10 zayıf asidin mobil faz pH' sına bağımlı olarak belirlenen alıkonma zamanının (t_R) sigmoidal ilişkisini tanımlamaktadır. Sıvı kromatografik kolonda zayıf asidin iyonik formu, nötral formundan daha az tutunur ($t_{RA-} < t_{RHA}$). Eşitlik 1.10 sadeleştirildiğinde aşağıdaki eşitliğe dönüştürülür.

$$\log t_R = \log t_{RHA} + \log(1 - D) \quad (1.10)$$

t_{RA-} değerinin t_{RHA} 'ya oranlanması ile f parametresi tanımlanabilir (Eşitlik 1.11).

$$f = t_{RA-}/t_{RHA} \quad (1.11)$$

Eşitlik 5, f değerine bağımlı olarak tekrar aşağıdaki şekilde yazılabilir (Eşitlik 1.12).

$$\log t_R = \log t_{RHA} + \log[1 - D(1 - f)] \quad (1.12)$$

$\log[1 - D(1 - f)]$ bileşiğin iyonlaşmasını açıklamak için çözünen tanımlayıcısı olarak kullanılabilir.

D kullanılarak hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde oluşan doğrunun doğrusal olması beklenir. Bunun yanısıra eğim değerinin 1 ve kesim değerinin 0 veya sıfıra yakın olması gerekmektedir (Roses vd., 1998).

1.6. İyonlaşan Analitin Alıkonmasında Organik Modifiyerin Etkisi

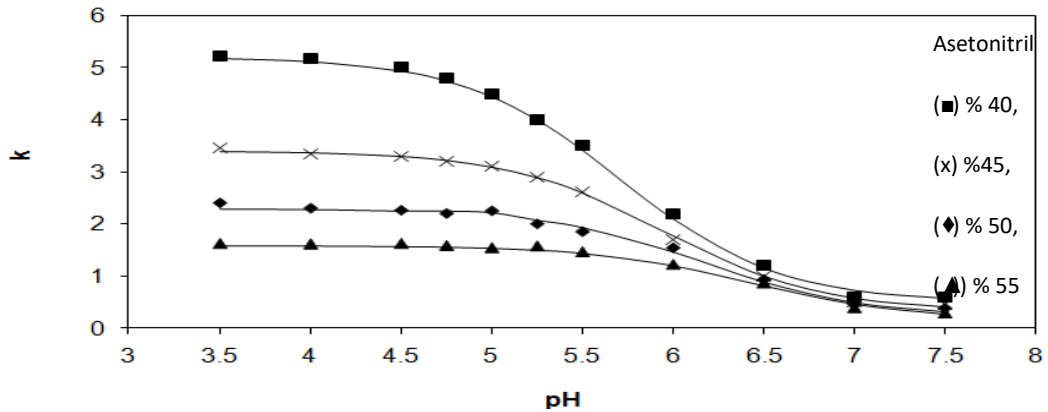
Ters faz sıvı kromatografi ayırmalarında, hareketli faz sabit faz yüzeyinden daha polar (daha hidrofilik) olmalıdır. Bu ayırmalarda su-organik çözücü karışımlarında genellikle metanol veya asetonitril tercih edilmektedir. Organik modifiyerin seçimi ayırmanın seçiciliğini etkileyecektir. Çünkü metanol ve asetonitril dipol moment, asitlik ve baziklik gibi farklı solvatokromik özelliklere

sahiptir (Çizelge1.2). Asetonitril yüksek bir dipol momente sahiptir ve asitliği (hidrojen bağ donörü) oldukça baskındır. Buna karşın metanol daha düşük dipol momente sahiptir ve bazikliği (hidrojen baği akseptörü) oldukça baskındır ve oldukça düşük elüsyon gücüne sahiptir. Su ile bu çözücülerin oluşturduğu ikili ve üçlü karışımlar metot geliştirme esnasında ayırma seçiciliğinde kullanılmaktadır. Asetonitril düşük UV absorbansa, düşük viskoziteye ve yüksek kaynama noktasına sahip olduğundan sıklıkla kullanılmaktadır.

Çizelge 1.2. Ters faz sıvı kromatografide yaygın kullanılan çözücülerin solvatokromik ve fizikokimyasal özellikleri

Çözücü	Dipol moment	Asitlik α	Baziklik β	UV (nm)	Viskozite (mPa s)	Kaynama noktası (°C)	Polarite (P')
Su	0,39	0,43	0,18	200	1,00	100	9,0
Metanol	0,28	0,43	0,29	205	0,60	65	6,6
Asetonitril	0,60	0,15	0,25	190	0,37	82	6,2

Ters faz sıvı kromatografi yönteminde, %100 su ortamında çalışmak mümkündür. Fakat su ortamında yeterli çözünürlüğü olmayan bileşikler için mutlaka mobil fazda bir miktar organik modifiyer bulunması gerekmektedir. Asidik analitler için, su-organik çözücü ikili karışımında organik çözücünün artmasıyla bileşiğin pK_a değeri artmaktadır (Şekil 1.11). Şekilde naproksen için % 40, 45, 50 ve 55 (h/h) asetonitril-su ikili karışımları için pH' ya bağımlı kapasite faktörü değerleri kullanılarak elde edilen sigmoidaller görülmektedir.



Şekil 1.11. Asidik analitin pK_a değerine organik modifiyerin etkisi

1.7. Ters Faz Sıvı Kromatografi Yönteminde Su Ortamındaki pKa Değerlerinin Belirlenmesi

Ters faz sıvı kromatografi yönteminde % 100 su ortamında çalışılabilir. Fakat çalışılan bileşiklerin hepsi suda çözünemeyebilir. Bunun için mobil faza bir miktar organik modifiyer ilave etmek gerekir. Mobil fazda organik modifiyerin varlığı analitin pK_a ' sını direkt olarak etkiler. Bir bileşiğin su ortamında çözünmemesi bileşiğin su ortamındaki pK_a değerinin hesaplanması için engel teşkil etmemektedir. Bileşiğin su-organik çözücü karışımında elde edilen pK_a verileri kullanılarak farklı metotlarla bileşiğin sudaki değerini hesaplamak mümkündür. Su ortamındaki pK_a değerlerinin hesaplanması için birçok metot olduğundan, tez kapsamında kullanılan organik modifiyer derişimi farklı olan ortamdaki mol kesri- pK_a değerleri kullanılarak hesaplama ve solvatokromik çözücü parametresi (E_T^N) kullanılarak yapılan hesaplama yöntemleri anlatılacaktır (Takacs-Novak vd., 1997; Avdeef vd., 1999; Babić, 2007).

1.7.1. Mol kesri-pKa yöntemi

Bu yöntemde mutlaka mobil fazda kullanılan organik çözücünün hacimce kesrine karşılık mol kesri değerlerinin bilinmesi gereklidir (Çizelge 1.3, Çizelge 1.4, Çizelge 1.5) (Rosés ve Bosch, 2002). Mobil fazdaki organik çözücünün mol kesrine karşı, mobil fazdaki pK_a (${}_s pK_a$) değerleri grafiğe geçirilerek lineer bir doğru elde edilir. Lineer doğrudan elde edilen fonksiyonun kesim noktası analitin sudaki pK_a değerini verir.

Çizelge 1.3. 25 °C' de metanol-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler

%MeOH (h/h)	Mol Kesri (X_{MeOH})	Yoğunluk ($kg\ dm^{-3}$)	pK_{su}
0	0,000	0,995	14,00
10	0,047	0,983	14,08
20	0,100	0,969	14,08
30	0,160	0,955	14,07
40	0,229	0,939	14,09
50	0,308	0,921	14,14
60	0,400	0,901	14,23
70	0,509	0,878	14,39
80	0,640	0,852	14,63
90	0,800	0,822	15,04
100	1,000	0,787	16,77

Çizelge 1.4. 25 °C' de asetonitril-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler

%ACN (h/h)	Mol Kesri (X_{ACN})	Yoğunluk ($kg\ dm^{-3}$)	pK_{su}
0	0,000	0,995	14,00
10	0,040	0,983	14,24
20	0,079	0,968	14,47
30	0,130	0,950	14,74
40	0,186	0,931	15,08
50	0,260	0,908	15,48
60	0,339	0,885	15,90
70	0,440	0,859	16,42
80	0,578	0,829	17,14
90	0,755	0,802	17,13
100	1,000	0,782	34,40

Çizelge 1.5. 25 °C' de tetrahidrofuran-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler

% THF (h/h)	Mol Kesri (X_{THF})	Yoğunluk ($kg\ dm^{-3}$)	pK_{su}
0	0,000	0,991	14,00
10	0,024	0,993	14,12
20	0,053	0,989	14,31
30	0,087	0,983	14,52
40	0,129	0,974	14,79
50	0,182	0,964	15,13
60	0,250	0,950	15,56
70	0,342	0,937	16,14
80	0,471	0,921	-
90	0,667	0,903	-
100	1,000	0,882	34,7

1.7.2. Solvatokromik Çözücü Parametresi (E_T^N) Kullanılarak Hesaplama Yöntemi

Bu yöntem kullanılarak bileşiğin için mobil fazdaki organik modifiyerin farklı yüzdelерinde hesaplanmış olan solvatokromik çözücü parametresine (E_T^N) karşı pK_a değeri nin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıda solvatokromik çözücü parametresi (x) yerine su ortamındaki solvatokromik çözücü parametresinin sabit değeri 0,46 konularak bileşiğin su ortamındaki iyonlaşma sabiti değeri belirlenir.

1.8. Metot Validasyonu Parametreleri

Metot Validasyonu, uygun kesinlik ve doğruluk ile metodun güvenilirliğini gösteren ölçüm işlemleridir. Bu işlemin amacı, seçilen metodun istenen amaca uygun nitelikte sonuç verdiğini belirlemek ve metodun sürekli kullanımı sırasında istenen performansı sağlayan koşulları belirlemek ve kontrol altında tutmaktır. Bu bölümde metot validasyonu için gerekli olan istatistiksel parametreler açıklanacaktır.

1.8.1. Güven Sınırları, Güven Aralığı Ve Güven Seviyesi

Güven sınırları, güven aralığı ve güven seviyesi tayinleri önemli işlemlerdir. Çünkü bu tayinler yardımıyla kendisine hiçbir zaman ulaşamayan doğru veya gerçek değere (μ), yaklaşılr veya doğru değeri içinde bulunacağı konsantrasyon aracılığı belirli bir ihtimalle belirlenir. Bu aralığın iki ucuna güven sınırları, bu iki uç arasındaki açıklığa güven aralığı, doğru değeri hangi ihtimalle (yüzde olarak) bu sınırlar içinde bulunacağına da, güven seviyesi denir (Gündüz, 2010).

1.8.2. Doğruluk

Doğruluk, doğru veya gerçek değeri, bulunan ortalama değeri arasındaki farktır. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir. Ortama ilave edilen analitin analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir. Seçilen her bir

derişim için minimum 5 tayin yapılmalıdır (Riley ve Rosanske, 1996). Doğruluk mutlak veya bağıl olarak verilir.

1.8.2.1. Mutlak Bağıl ve Yüzde Bağıl Hatalar

Mutlak hata, bir aletin veya cihazın üreticisi tarafından tespit edilen hatasıdır. Bağıl hata ise boyutsuz bir sayıdır. Bağıl hataya, bağıl standart sapmada denir ve bias (% Bias) olarak ifade edilir. Bias, genelde sistematik hata anlamında kullanılır. Böyle bir hata artı veya eksi olabilir. Bağıl standart sapma genellikle % olarak ifade edilir (%BSS) (Eşitlik 1.13, Eşitlik 1.14)(Gündüz, 2010).

$$\%BSS = \frac{SS}{X_{ort}} \times 100 \quad (1.13)$$

$$\%BH = \frac{GD - X_{ort}}{GD} \times 100 \quad (1.14)$$

GD: Gerçek Değer

SS: Standart Sapma

X_{ort}: Ortalama Değer

1.8.3. Kesinlik

Kesinlik ve doğruluk çok önemli ayrı iki terim olmalarına rağmen, çoğu zaman birbirleriyle karıştırılır. Bir analizde bulunan sonuçların birbirine yakınlığına kesinlik denir. Kesinliğin bir başka tanımı da, bir grup analiz sonucunda en küçük sonuçla en büyük sonuç arasındaki farktır (yayılmadır). % BSS (Bağıl Standart Sapma) veya % VK (Varyasyon Katsayısı) olarak ifade edilir. Ölçüm yapılan herbir derişim için minimum 5-6 tayin yapılmalıdır. Kesinlikle doğruluk arasında direkt bir bağlantı yoktur. Bir analizde, sonuçların kesinliğine bakarak doğruluk hakkında kesin bir şey söylenemez. Kesinlik, standart sapma ve bağıl standart sapma; varyans; yayılma ve sapma, ortalama sapma ve bağıl ortalama sapma terimleri ile ifade edilebilir (Gündüz, 2010).

1.8.4. Standart Sapma

Standart sapma analizle (ölçümle) bulunan sonuçların ortalama değer etrafında dağılımını gösteren bir kesinlik parametresidir. Bu parametreye (standart sapmaya) sonuçların ortalama değer etrafında değişkenlik değeri de denir. Bir analizde hesaplanan standart sapma değeri ne kadar küçükse, analizin kesinliği o kadar iyidir veya yüksektir denir (Gündüz, 2010).

Kesinlik, tekrarlanabilirlik (repeatability), orta kesinlik (intermediate precision) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) olmak üzere üç kısımda incelenmektedir.

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralığı içerisinde aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltilerden en az 10 ölçüm yapılır. Bu tekrar edilebilirlik gün içi veya çalışma sırasındaki kesinlik olarak da adlandırılır. Sonuçta, kesinlik elde edilen değerlerin %BSS' ı verilerek ifade edilir ve $\%BSS \leq 1,0$ olmalıdır.

Orta kesinlik, çalışmalar arası, deneyler arası veya günler arası kesinlik olarak tanımlanan bu değer çalışmanın tam anlamda kesinliğini belirtir. Bu kesinliği sağlayan çalışma diğer kesinlik parametrelerini de sağlamış olur.

Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm, farklı günlerde ve/veya farklı analizciler tarafından ve/veya farklı cihazlarla yapılır. Sonuçta, orta kesinlik elde edilen değerlerin %BSS' ı verilerek ifade edilir ve $\%BSS \leq 2,0$ olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

1.8.5. Seçicilik

Analizi yapılacak maddenin numunede bulunan girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Seçicilik, miktar tayini sırasında

gerekli validasyon işlemleri yapılırken, teşhis testleri ve safsızlıkların tayini sırasında yapılmalıdır.

1.8.6. Gözlenebilirlik Sınırı (LOD)

Analizi yapılan örneğin belirlediği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt derişimdir. Doğrudan yapılan deneylerden, gözlenerek yapılan hesaplamalarda genel olarak sinyal/gürültü (signal/noise) oranı 3 olarak alınır.

Teşhis sınırı, Eşitlik 1.15 kullanılarak hesaplanır.

$$LOD= 3 \times SS / m \quad (1.15)$$

eşitliği kullanılır. Bu eşitlikte SS= Kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçlarının veya ilgili kalibrasyon doğrusunun kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.

1.8.7. Tayin alt sınırı (LOQ)

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırları içerisine girmeyen veya kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişim düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek LOQ tesbiti için genel olarak sinyal/gürültü oranı 10 olarak alınır.

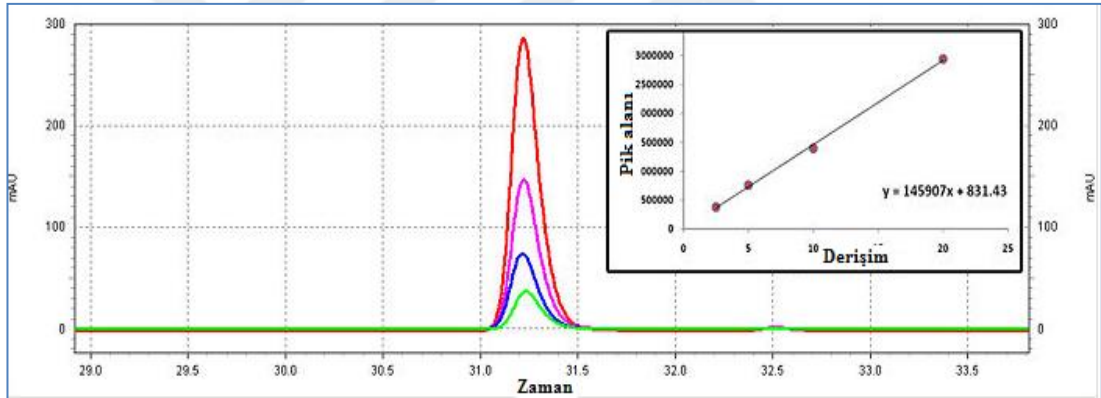
Tayin alt sınırı, Eşitlik 1.16 kullanılarak hesaplanır.

$$LOQ= 10 \times SS / m \quad (1.16)$$

eşitliği kullanılır. SS= Kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. SS ve m değerleri LOD eşitliğinde kullanılan değerlerle aynıdır.

1.8.8. Doğrusallık

Derişime karşı cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Doğrusal aralığın belirlenmesinde, içerisinde tayini yapılacak madde derişimleri bilinen en az 5 değişik derişim içeren çözeltinin analiz edilmesi gerekir. Kalibrasyon grafiğı elde edildikten sonra, bu grafik kullanılarak herhangi bir numune içerisindeki aranılan madde derişimi Şekil 1.12' den de görüleceğı gibi bu doğrusal grafikten elde edilen bağıntıdan bulunabilir (Miller ve Miller, 2008). Bir analizde elde edilen bir seri noktayı en iyi temsil edecek doğrunun çizilebilmesi için en küçük kareler metodundan yararlanılır. Bir seri analiz sonucuna regresyon analizi uygulanarak korelasyon katsayısı (r) belirlenir. Korelasyon katsayısı iki değişken arasındaki bağıntının (ilginin) bir ölçüsüdür. Bu bağıntı genel olarak r ile gösterilir ve r değeri +1 ile -1 arasında değişir.



Şekil 1.12. HPLC yöntemi ile kalibrasyon işlemi

Kalibrasyon doğrusu, 3 farklı metotla çizilebilir. Bunlar;

- Dış standart metodu,
- İç standart metodu
- Standart ekleme metodudur.

Dış standart metodu en basit kalibrasyon eğrisi çizme metodudur ve bundan dolayı basit analitik problemler için kullanılmalıdır. Elde edilen sonuçlar tekrarlanabilir olmalıdır.

İç standart metodu, enjeksiyon hacminden gelebilecek hataları bertaraf etmek için kullanılan önemli bir metottur. Numune hazırlama ve numune uygulama sırasında olabilecek numune kayıplarının düzeltilmesi amacıyla kullanılır. İç standart metodunda, kalibrasyon grafiği analit sinyalinin iç standart sinyaline oranı olarak grafiğe geçirilir. Uygun iç standart madde seçmek çok kolay olmayabilir. Bu yöntemde seçilen iç standart madde, saf olmalı, numune matriksinde numuneye karşı reaktif olmamalı, numunenin diğer bileşenlerinden tamamen ayrılmalı, benzer dedektör yanıtına sahip olmalıdır (Gündüz, 2010).

Standart ekleme metodu analiz edilecek madde miktarı sınırlı değilse iyi bir metottur. Matriks etkinin büyük ölçüde var olduğu karmaşık numunelerin analizinde standart ilave yöntemi yaygın olarak kullanılır. Standart ilave yöntemi ile yapılan çalışmalarda numune ortamına belli hacimlerde standart eklenir. Bu katkılı çözeltilerde okunan dedektör sinyaline her iki derişimin (numune, ilave edilen standart) katkısı vardır. Standardın ilave edilen hacmi ile okunan sinyal arasında lineer bir ilişki vardır. Bu ilişkiden yararlanılarak bilinmeyen derişimine geçilir.

1.9. Katı Faz Ekstraksiyonu Yöntemi

Numune hazırlama işleminde zaman kaybının önlenmesi ve analiz maliyetinin azaltılması amacıyla, 1970'li yılların ortalarında klasik metotlara alternatif olarak yeni bir teknik olan katı faz ekstraksiyon metodu (solid phase extraction, SPE) kullanılmaya başlanmıştır. Günümüzde en etkili örnek hazırlama yöntemlerinden olan SPE, özellikle çevre ve gıda, analitik biyokimya, farmasotik biyoanaliz, toksikoloji ve adli tıp, kozmetik analizlerinde kullanılan numune hazırlama yöntemlerin başında gelmektedir.

SPE yöntemi, temel olarak küçük, tek kullanımlık ekstraksiyon kolon veya disklerine çeşitli tutucu maddelerin doldurulması ve sıvı örneklerini istenmeyen bileşenlerden ayırma (temizleme), yoğunlaştırma ve sonraki analiz aşamaları için örnek matriks yapısının değiştirilmesi amaçlarıyla hazırlanmış olan kolon ve disklerden geçirilmesi esasına dayanmaktadır. Sıvı örneğin kolondan

geçirilmesi, yerçekimi vasıtasıyla gerçekleştirilebildiği gibi, zaman kaybının önüne geçmek amacıyla vakum yardımıyla da yapılabilir. Son yıllarda aynı prensiple çok daha düşük miktarda örneğin uygulandığı çok sayıda SPE plakaları da kullanılmaktadır (Yavuz ve Aksoy, 2006).

SPE metodunda kolondan geçirilme sırasında örnek molekülleri ile tutucu madde arasında kimyasal bir etkileşim meydana gelir. Bu etkileşimden faydalanarak maddelerin ayrılma işlemi başlıca iki yolla gerçekleştirilir. Birinci yöntemde ilk aşamada, analiz edilecek bileşik tutucu maddeye bağlanarak kolon içinde tutulurken, çözelti ve istenmeyen bileşenler bu madde ile herhangi bir etkileşime girmezler. Daha sonra istenmeyen bileşenler uygun yıkama çözeltisi ile uzaklaştırılır ve analiz edilecek bileşen tutucu maddeden uygun bir çözelti yardımıyla çözdürülerek alınır (Yavuz ve Aksoy, 2006).

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu tez çalışmasında geniş bir kullanım alanı olan antibiyotik grubu tetrasiklinler ve epimerlerinin iyonlaşma sabitlerinin tayini ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle farklı derişimlerdeki asetonitril-su ikili karışımlarında yapılmıştır. Literatürde tetrasiklinlerin çeşitli analitik yöntemlerle (potansiyometrik, spektrofotometrik, ters faz sıvı kromatografi) iyonlaşma sabitlerine dair veriler vardır. Fakat bu bileşiklerinin epimerlerinin pK_a değerlerine ait literatürde hiçbir veri yoktur. Ayrıca bu bileşiklerin pK_a değerlerinin tayini yeni bir teknoloji "Core shell" tekniğiyle yapılmış sıvı kromatografik kolonla gerçekleştirilmiştir. Ayrıca tezde tayini yapılan bileşiklerin belirli pH aralığında elde edilen kapasite faktörü, ayırma gücü ve seçicilik faktörü değerleri göz önüne alınarak aynı anda ayrılma koşulu belirlenmiştir. Bu şekilde yapılmış hiçbir çalışma olmadığı detaylı literatür araştırması sonucu belirlenmiştir.

Seçilen bileşiklerin iyonlaşma sabiti tayinine dayalı literatür özetleri aşağıda verilmiştir.

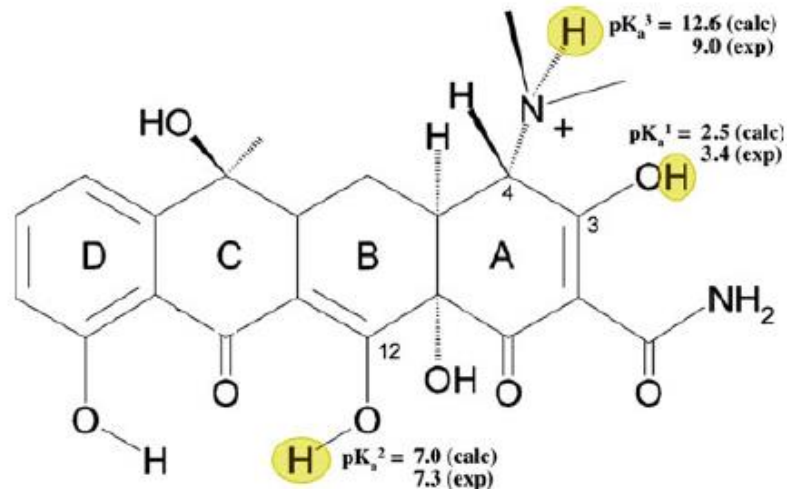
Qiang ve Adams (2004), insan ve hayvan hastalıklarının tedavisinde kullanılan 26 antibiyotiğin pK_a değerlerini potansiyometrik yöntemle tayin etmişlerdir. 2. türev yaklaşımı ve non-linnee regresyon programlarıyla bileşiklere ait pK_a değerleri hesaplanmıştır. Elde ettikleri verileri literatür verileriyle karşılaştırmışlardır. Çalışmacılar tetrasiklin grubunda bulunan bütün antibiyotiklerin pK_{a1} , pK_{a2} ve pK_{a3} değerlerini hesaplamışlardır. Bu tayinle sırasıyla 3-4; 7-8; 9-10 aralığında pK_a değerleri hesaplamışlardır.

Şanlı vd (2009), potansiyometrik titrasyon ve ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle beş tetrasiklinin(tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin, doksisisiklin ve metasiklin) pK_a değerlerini su ve asetonitril-su ikili karışımlarında (%10, %20, %30, v/v) tayin etmişlerdir. Çalışmacılar bileşiklerin potansiyometrik titrasyonla 3 pK_a ' sında tayin etmişlerdir. RPLC' de sadece pK_{a1} ' i tayin etmişler ve tayin esnasında klasik C18 kolon kullanmışlardır. Çalışmacılar su-asetonitril ikili karışımlarında elde ettikleri pK_{a1} değerlerini

kullanarak mol kesri-pK_a yöntemiyle su ortamındaki pK_a değerlerini hesaplamışlardır. Elde ettikleri değerleri de SPARC programıyla karşılaştırmışlardır.

Ghasemi ve Jajalvand (2011), spektrofotometrik yöntemle tetrasiklinin asidik ve bazik iyonlaşma sabitlerini asetonitril-su ve metanol-su ikili karışımlarında tayin etmişlerdir. Çalışmada spektral pH-absorbans değerleri kullanılarak kemometrik yöntemle veri değerlendirmesi yapmışlardır. Spektrofotometrik tirasyonda tetrasiklin bileşiği 5.10⁻⁵ M olarak hazırlanmıştır. Titrasyon 200-450 nm arasında pH 2-12 aralığında yapılmıştır. Ayrıca bileşiğin su ortamındaki pK_a değerleri kamlet Taft parametreleri kullanılarak belirlenmiştir.

Amat vd. (2012), çalışmalarında tetrasiklinin iyonlaşma sabiti değerlerini SPARC bilgisayar programı ile hesaplamış ve bu bileşiğin yapısal analizini yapmıştır. Çalışmacılar 3 numaralı karbon üzerinde bulunan OH grubuna ait pK_{a1} değerini 2,5; 12 numaralı karbon üzerinde bulunan OH grubuna ait pK_a değerini 7 ve 4 numaralı karbon üzerinde bulunan amonyum katyonuna ait pK_{a3} değerinin 12,6 olarak hesaplamıştır. Hesaplanan bu değerleri literatürdeki mevcut deneysel değerlerle karşılaştırmıştır (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Tetrasiklinin deneysel ve bilgisayar programı ile hesaplanmış pK_a değerleri

Tetrasiklin bileşiklerinin ve epimerlerinin farklı numunelerde tek başlarına veya birlikte tayinine yönelik çalışmalar literatürde yer almaktadır. Bileşiklerin

ters faz sıvı kromatografi yöntemi ile farklı ortamlardaki tayinlerine ve validasyonlarına yönelik güncel literatür çalışmalarının özetleri aşağıda verilmiştir.

Iwaki vd. (1992), Floresans dedektör kullanarak hassasiyeti yüksek ters faz sıvı kromatografi yöntemini tetrasiklin antibiyotiklerinin (TC'lerin) tespiti için gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntem, mobil fazda floresans-arttırıcı reaktifler olarak disodyum etilen daimin tetra asetatik asit (EDTA) ve kalsiyum klorür kullanımına dayanmaktadır. Hareketli fazdaki bu reaktiflerin konsantrasyonları, TC'lerin floresans duyarlılığını büyük ölçüde etkilemiştir. EDTA ve kalsiyum klorürün konsantrasyonu sırasıyla 25 ve 35 mM ve hareketli fazın pH değeri 6,5 olduğu koşulda maksimum floresans duyarlılığı elde edilmiştir. Kolon sıcaklığı floresans duyarlılığı çok etkilemiştir. Enjekte edilen 3.75 ng'lik TC'lerde kesinlik (bağıl standart sapma) % 1.12 ile 2.20 arasında hesaplanmıştır. Tetrasiklin ve oksitetrasiklin için 0.075-37.5 ng ve klortetrasiklin için 0.225-37.5 ng aralığında doğrusalılık tayin edilmiştir. Bu yöntemin tespit limitleri üç farklı TC için 49-190 pg arasında hesaplanmıştır. Önerilen yöntem, iç standart yöntemiyle farmasotik formülasyonlara ve balık dokularına da uygulanmıştır.

Cinquina vd. (2003), sığır sütü ve dokularında tetrasiklinlerin belirlenmesi için diyot-dedektöre sahip yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC-DAD) yöntemini optimize etmişlerdir. Alınan süt ve doku numuneleri katı fazlı ekstraksiyon özellikli Oasis HLB kartuşu kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Bileşikler 365 nm' de analiz edilmişlerdir. Analizler, 0,01 M okzalik asit-asetonitril-metanol (60:25:15, v/v/v) içeren mobil faz ve C8 kolonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Tetrasiklin geri kazanımları sütte %81,1; kas da ise %83,2 den yüksek hesaplanmıştır. Bu yöntemin sığır sütü ve kası için SANCO/1805/2000 European Decision'ın belirlediği şartlara uygun olduğu doğrulanmıştır. Tüm süt ve kas bileşikleri için dedeksiyon limitleri süt ve kas bileşikleri için sırasıyla 117,2-131,3 µg/kg ve 114,9-133,1 µg/kg arasında hesaplanmıştır.

Fritz ve Zuo (2007), Sütte tetrasiklin (TC), 4-epitetrasiklin (4-epiTC) ve oksitetrasiklin (OTC) tayini için DAD dedektörlü sistemle (HPLC-PAD) ters faz yüksek performanslı bir sıvı kromatografisi ile metot optimizasyonu ve validasyonu yapmışlardır. Ayırma, oda sıcaklığında Waters Symmetry C18 kolonla, 0,010 M sulu okzalik asit: asetronitril: metanol (150: 20: 20, v/v) içeren bir mobil faz ile 8 dakikadan daha kısa bir sürede gerçekleştirildi. Süt örneklerinin tayini için katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmış ve işlem Discovery SPE DSC-18 kolonlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir tetrasiklinin kalibrasyon fonksiyonlarının hesaplanmasında pik alanları kullanılmıştır. Bileşiklerin dedeksiyon limitleri 2 µg/L altında hesaplanmıştır. TC, 4-epi TC ve OTC'nin ortalama geri kazanımları sırasıyla %91.5, 71.5 ve 83.1 olarak hesaplanmıştır. Bu yöntem, yerel süpermarketlerden satın alınan süt örnekleri içinde TC, 4-epiTC ve OTC'nin aynı anda tespiti için uygulanmıştır.

Wang vd. (2008), bu çalışmada, dört tetrasiklin antibiyotiğinin aynı anda belirlenmesi ve ayrımı için Rezonans Raman Spektroskopisine (HPLC-RRS) sahip yeni bir ters farz yüksek performans sıvı kromatografisi geliştirmiştir. Bileşikler Synergi Fusion-RP kolon kullanılarak akış hızı 0.8 mL/dk olan metanol-asetonitril-okzalik asit (5mM) mobil faz karışımıyla iyi bir kromatografik ayırım gerçekleştirilmiştir. Kolon sıcaklığı 30 oC olarak ayarlanmıştır. Rezonans Raman Spektroskopisi (RRS) sinyali 370 nm'de tespit edilmiştir. Dedeksiyon limitleri oksitetrasiklin için 10,36-518,0 µg/mL, tetrasiklin için 12,11-605,5 µg/mL, klortetrasiklin için 11,79-589,5 µg/mL, doksisisiklin için 10,32-516,0 µg/mL olarak tespit edilmiştir. Lineer regresyon katsayıları tümü için 0,999' un üstünde hesaplanmıştır. Yöntem ilaç formülleri ve baldaki OTC, TC, CTC ve DC'nin belirlenmesi için başarılı şekilde uygulanmıştır. Yöntem kolay, hızlı ve yüksek tekrarlanabilirlik göstermiştir.

Cristofani vd. (2008), bu çalışmada, HPLC-DAD tekniğiyle hayvan kaslarında tetrasiklinlerin (tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin ve doksisisiklin) ve 4-epimerinin (4-epitetrasiklin, 4-epioksitetrasiklin ve 4-epiklortetrasiklin) belirlenmesini sağlamışlardır. Numuneler, iç standart olarak metasiklin ilavesinden sonra 0,1 M süksinik asit (pH 4) ve metanol karışımı ile ekstrakte edilmişlerdir. Ekstraksiyon işlemi OASIS HLB polimerik ters fazlı kolonda

gerçekleştirilmiştir. Yedi analitin kromatografik ayrımı gradient elüsyonla kısa bir monolitik kolonda 10 dk'da gerçekleştirilmiştir. Geliştirilen metodun sığır kasında Commission Decision 2002/657/EC kriterine uygun olduğu tespit edilmiştir. Numuneler dört konsantrasyon seviyesinde analiz edilmiştir. Yöntem doğruluğu ve hassaslığının (tekrarlanabilirlik) yanı sıra LOD ve LOQ değerleride rapor edilmiştir.

Nikolaidou vd. (2008), bu çalışmada, 375 nm'de tavuk kası ve yumurta sarısında yedi tetrasiklinin (minosiklin, tetrasiklin, oksitetrasiklin, metasiklin, demoklosiklin, klortetrasiklin ve doksisisiklin) belirlenmesi için HPLC-DAD yöntemini geliştirmişlerdir. Kalitatif tayinleri yapılmış olan tetrasiklinler, tavuk kasından % 15 TFA ve 0,4 M okzalit tamponu (pH 4) karışımı kullanılarak ekstrakte edilmişlerdir. Tavuk kası ve yumurta sarısından daha yüksek geri kazanım elde etmek için LiChrolut ve Nexus katı faz kartuşları kullanılmıştır. Bu ekstraksiyon işlemi için 0,01 M C₂H₂O₄ / CH₃CN / CH₃OH (40:30:30 v/v/v) karışımını içeren elüsyon çözeltisi kullanılmıştır. Ayırma, Kromasil ODS-3 analitik kolonunda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz, 0,01 M okzalik asit ve CH₃CN karışımından elde edilmiştir. Belirleme, seçicilik, dedeksiyon limiti, kantitatif yorum sınırı, doğruluk, kesinlik ve hassaslık gibi validasyon kriterlerinin Decision 2002/657/EC protokolüne uygun olduğu doğrulanmıştır. Tavuk kasları ve yumurtalar için geri kazanımlar % 92-110,1 ve % 89-106 olarak sıralanmıştır. Tüm bağıl standart sapma (RSD) değerleri % 11' den düşük hesaplanmıştır. Tavuk dokularında ve yumurtada dedeksiyon limiti sırasıyla 113,45-118,18 µg/kg ve 206,53- 214,60 µg/kg olarak tayin edilmiştir.

Gajda ve Posnyak (2009), tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklinin ve 4-epimerinin ve doksisisiklinin hayvan dokularında aynı anda tayini için ters faz sıvı kromatografi yöntemini geliştirmişlerdir. Biyolojik matrikserden analitlerin ekstraksiyonu 0,02 M okzalik asit (pH 4) çözeltisinde gerçekleştirilmiştir. Kullanılan katı faz ekstraksiyonu için polimerik kartuşlar tercih edilmiştir. Kromatografik ayırma C18 kolonda asetonitril, metanol ve 0,02 M okzalik asiti içeren mobil fazda gradient modda gerçekleştirilmiştir. Dedeksiyon UV dedektörle $\lambda = 355$ nm de yapılmıştır. Katkılandırılmış numunelerden analitlerin geri kazanım değerleri %50-%80 arasında hesaplanmıştır.

Jing vd. (2009), gıda maddelerinden tetrasiklin antibiyotiklerin (TC'lerin) katı faz ekstraksiyon yöntemi olarak moleküler baskılama tekniğiyle kullanarak hızlı, spesifik ve hassas bir yöntem geliştirmiştir. MIP' lerdeki boşluklar tayini yapılacak olan tetrasiklinlerin tayini için hazırlanmıştır. Belirlenen optimum koşullar altında MIP ler için baskılama faktörleri sırasıyla 4.1 (oksitetrasiklin), 7.0 (tetrasiklin), 7.4 (chlortetrasiklin), 7.7 (doksisisiklin) olarak hesaplanmıştır. Ayrıca, MIPlerin katı faz ekstraksiyon emici olarak performansı değerlendirilmiş ve moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu (MISPE) prosedürünün yüksek ekstraksiyon verimliliği gösterilmiştir. Ticari kartuşlarla karşılaştırıldığında, MISPE, C18 ve Oasis HLB kartuşundan daha iyi bir ekstraksiyon verimi ve daha yüksek bir geri kazanma sağlamıştır. Son olarak, sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi ve moleküler baskılanmış katı faz ekstraksiyonu ile birleştirilen yöntem, ıstakoz, ördek, bal ve yumurta gibi gerçek örneklerde de valide edilmiştir. TC'lerin katkılandırılmış geri kazanımları % 94.51 ile % 103.0 arasında hesaplanmıştır.

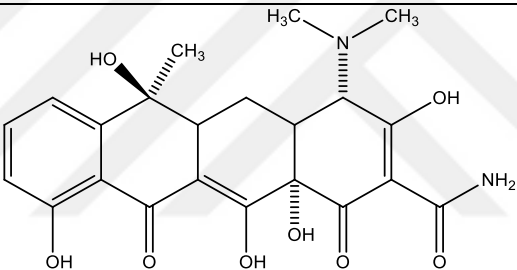
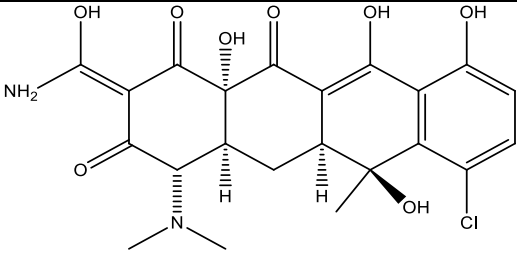
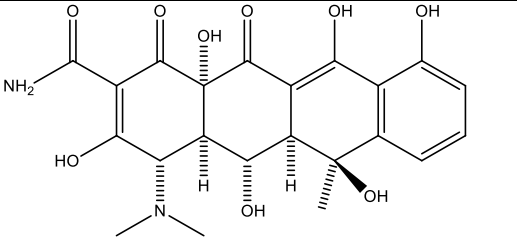
3. MATERİYAL VE METOT

Bu bölümde tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin, 4-epitetrasiklin, 4-epiklortetrasiklin ve 4-epioksitektrasetrasiklinin iyonlaşma sabitlerinin, su-asetonitril karışımında ters faz sıvı kromatografik yöntemle tayininde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

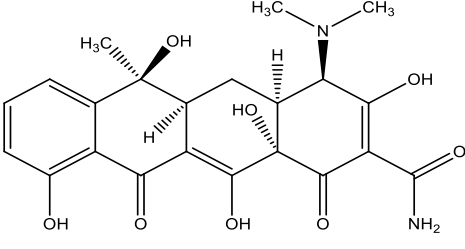
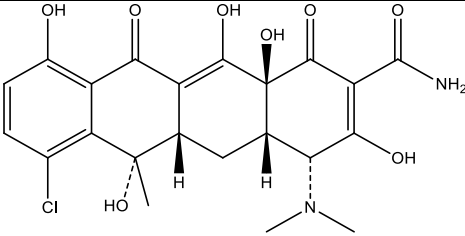
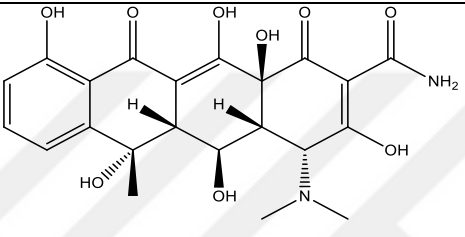
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır. Bu tezde çalışılan bileşiklerin özellikleri Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2' de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışılan bileşikler ve özellikleri

Bileşik	Kimyasal Yapısı	Bileşik Özellikleri
Tetrasiklin $C_{22}H_{24}N_2O_8$		M.A: 444,44 g/mol UV@275 nm Temin edildiği firma: Acros
Klortetrasiklin $C_{22}H_{23}ClN_2O_8$		M.A: 478,88 g/mol UV@270 nm Temin edildiği firma: Acros
Oksitetrasiklin $C_{22}H_{24}N_2O_9$		M.A: 460,439 g/mol UV@270 nm Temin edildiği firma: Acros

Çizelge 3.2. Çalışılan bileşikler ve özellikleri (Devam)

4-Epitetrasiklin C₂₂H₂₄N₂O₈		M.A: 480,90 g/mol UV@255 nm Temin edildiği firma: Sigma
4-Epiklortetrasiklin C₂₂H₂₃ClN₂O₈		M.A: 515,35 g/mol UV@255 nm Temin edildiği firma: Acros
4-Epioksitetrasiklin C₂₂H₂₄N₂O₉		M.A: 460,44 g/mol UV@255 nm Temin edildiği firma: Acros

Kromatografik çalışmalarda yararlanılan diğer kimyasal maddeler ve özellikleri, Çizelge 3.3' de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Sodyum hidroksit	Mobil faz pH'sının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Urasil	Kolonda tutunmayan türün kolonu terk etme zamanını belirlemede	Merck, analitik saflıkta
Potasyum hidrojen fitalat	Elektrot kalibrasyonu için referans standart	Merck (Referans Değer Standardı)
Asetonitril	Mobil faz için kullanılan organik çözücü	J. T. Baker, HPLC saflığında
Fosforik asit	Mobil faz pH'sının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta

3.2. Kromatografik Çalışmalar

3.2.1. Kullanılan cihazlar

3.2.1.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı

Çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının incelenmesinde ve pK_a değerlerinin tayininde, Shimadzu marka Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazı kullanılmıştır. Sistemde, pompa (LC-20AD), UV-Visible dedektör (SPD-20A), kolon fırını (CTO-20A) ve gaz giderme ünitesi (DGU-20A₃) bulunmaktadır.

3.2.1.2. pH/iyon metre

HPLC mobil fazının pH ölçümlerinde Metleer Toledo MA 235 pH/ İyon analiz cihazı kullanılmıştır. Metleer Toledo InLab 413 Ag/AgCl kombine cam elektrottan yararlanılmıştır. IUPAC' a göre asetonitril-su ve metanol-su ikili karışımlarında elektrot kalibrasyonu için potasyum hidrojen fitalat referans standart çözelti olarak seçilmiştir. Mobil faz pH'ının ayarlanması esnasında sıcaklık 25 °C ± 0,1 °C' de sabit tutulmuştur.

3.2.2. RPLC Kolon Seçimi

Literatür araştırmaları sonucunda yapılan bütün pK_a ve validasyon çalışmalarının geleneksel kolonlarla yapıldığı görülmektedir. Bu çalışmada çalışılan tetrasiklinlerin ve epimerlerinin ayrımı gerçekleştirileceğinden bu işlemin C18 ve C8 kolonlarla yapılması mümkün değildir. Geleneksel, tamamen gözenekli kolonlarda bileşiklerin tayininde bant genişlemesi ve uzun alıkonma zamanı sıvı kromatografik çalışmaları sınırlandırmaktadır. Bu yüzden kısa alıkonma zamanı ve etkin bir ayırma için son yıllarda ters faz sıvı kromatografik kolonlarda "Core Shell" tekniği tercih edilmektedir. Bu tezde bileşiklerin ve epimerlerinin tayininde bu teknik kullanılarak geliştirilmiş Kinetex F5 kolon (150x4,6 mm ID, 2,6 µm) kullanılmıştır. F5 (pentafluorofenil-propil) fazı, hidrojen bağı, hidrofobik, elektrostatik, aromatik ve sterik/düzlemsel mekanizmayı içeren polar ve polar olmayan etkileşimlerin kombinasyonu olarak bilinmektedir. Bu fazı içeren kolon polar ve polar olmayan asidik, bazik

ve nötral bileşiklerin tayini için kullanılmaktadır. Ayrıca izomer bileşiklerin tayininde de oldukça etkin bir ayırma sağlamaktadır. Bu kolonda mobil faz olarak daha çok asetonitril ve metanolün kullanımı tercih edilmektedir. Kolonun pH çalışma aralığı 1,5-8,5 arasındadır (Fibigr vd., 2017).

3.2.3. Kromatografik Çalışmalarda Kullanılan Çözeltiler

Kromatografik çalışmada bileşiklerin her birinden 0,0010 g tartılıp, 10 mL mobil fazda çözülerek 100 ppm' lik çözeltileri hazırlanmıştır. Bu bileşikler oda sıcaklığında bozunma ürünlerine dönüştüğü için kullanılıncaya kadar -18 °C' de saklanmış ve bileşik çözdürüldükten hemen sonra enjekte edilmiştir. Sıvı kromatografi cihazına her bir stok çözeltiden 20 µL enjekte edilmiştir. Her bir bileşik için üçer kez enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir. Bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin tayini için üç farklı asetonitril-su karışımında çalışılmıştır. Bu kromatografik çalışmalar için kolon sıcaklığı 25 °C, akış hızı 0,5 mL/dakika olarak belirlenmiştir.

3.2.3.1. %20 (h/h) Asetonitril-su İkili Karışımı

200 mL'lik stok ortam için 160 mL saf su alınmış ve üzerine 40 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza 30 mM derişimde olacak şekilde H₃PO₄ (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su - asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

3.2.3.2. %25 (h/h) Asetonitril-su İkili Karışımı

200 mL'lik stok ortam için 150 mL saf su alınmış ve üzerine 50 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir.

Mobil faza 30 mM derişimde olacak şekilde H_3PO_4 (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su - asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

3.2.3.3. %30 (h/h) Asetonitril-su İkili Karışımı

200 mL'lik stok ortam için 140 mL saf su alınmış ve üzerine 60 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza 30 mM derişimde olacak şekilde H_3PO_4 (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su - asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

3.2.3.4. Urasil çözeltisi

Çalışılan koşullarda kapasite faktörlerinin belirlenmesi için kullanılan urasil çözeltisi, derişimi %0,01 (a/h) olacak şekilde suda hazırlanmıştır. Urasilin hazırlanan bu çözeltisinden 20 µL enjekte edilerek kolonda tutunmayan türe özgü t_0 alıkonma zamanı belirlenmiştir. Çalışma dalga boyu 210 nm'dir.

3.2.3.5. Potasyum hidrojen fitalat çözeltisi

$C_6H_4(COOK)(COOH)$, primer standart pH referans çözeltisi olarak 0,05 molal derişimde kullanılmış ve pH metre bu bileşik için gerekli değere ayarlandıktan sonra mobil fazların pH değerleri ayarlanmıştır. 2 saat 110 °C'da kurutulmuştur. Çalışmalarda gerekli çözeltiler, kullanılacakları gün hazırlanmışlardır.

3.3. Yöntem

3.3.1. Sıvı kromatografik Yöntemle Tayin

HPLC yöntemi ile iyonlaşma sabitlerinin tayini çalışmasında, üç farklı asetonitril-su karışımlarında çalışılmıştır. pH metre, pH değerleri belirlenirken potasyum hidrojen fitalat çözeltisi ile ayarlanmıştır. pH metrenin kalibrasyonu, kombine pH elektrodu ile 298,15 K referans alınarak yapılmıştır. Elektrot, okunan değerlerin kararlı olabilmesi için çalışılan su-organik çözücü karışımında bekletilmiştir. Her bir ortam için potasyum hidrojen fitalat çözeltisi 0,05 mol/kg derişimde hazırlanmış ve başlangıç potansiyel değeri belirlenmiştir. Her bir çözelti için 3 ölçüm yapılmıştır. Takiben her bir koşula ait pH değeri 2,5-7 aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu ayarlama işlemlerinde tampon aralığı dikkate alınarak 30 mM fosforik asit kullanılmıştır. Bu asit ilavelerinden sonra mobil faza 1 M NaOH ilave edilerek istenen pH değeri sağlanmıştır.

Bilindiği gibi HPLC çalışmasında kapasite faktörleri, t_0 dikkate alınarak hesaplanır. Tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin, 4-epitetrasiklin, 4-epiklortetrasiklin ve 4-epioksite tetrasiklinin kapasite faktörlerinin hesaplanmasında kullanılacak t_0 değeri urasilin sudaki %0,01 (a/h) derişimindeki çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada gerek urasil ve gerekse bileşiklerin alıkonma zamanları, ikişer enjeksiyonla ölçümlerin ortalaması alınarak belirlenmiş ve bu değerler yardımıyla kapasite faktörleri (k) hesaplanmıştır.

3.3.2. Solver (Çözücü) Kullanılarak pK_a Tayini

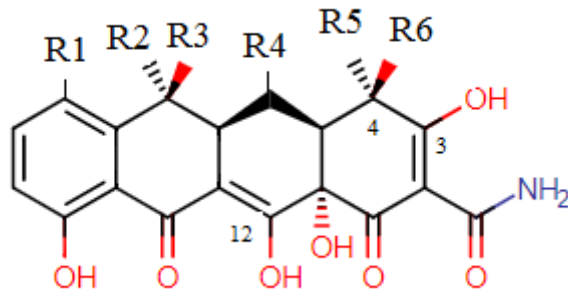
Solver (Çözücü), Windows için Microsoft Excel'de "Eklentiler" seçeneği kullanılarak etkinleştirilen ve elektronik tablo optimizasyon modelleme sistemi olarak kullanılan bir araçtır. Çeşitli doğrusal ve doğrusal olmayan eşitlikleri çözmek için kullanılır. Bir dizi deneysel veriyle bağımlı değişken üzerinde ilk parametreler seti kullanılarak tahmin edilmek istenen veri çözümlendirilerek belirlenir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Bu tezde tetrasiklin, oksitetrasiklin, klortetrasiklin ve epimerleri 4-epitetrasiklin, 4-epioksitebrasiklin, 4-epiklortetrasiklinin asidik iyonlaşma sabitleri pK_{a1} ve pK_{a2} değerlerinin tayini RPLC metodu ile gerçekleştirilmiştir. Tetrasiklin grubu bileşiklerin yapısında iki asidik grup ve bir tane de bazik grup bulunmaktadır. Bu çalışmada çalışılan HPLC kolonun pH aralığı 1,5-8,5 olduğu için bileşiklerin sadece asidik fonksiyonel grupları tayin edilmiştir. Bileşiklerin iyonlaşan kısımlarına ait pK_a değerleri, tahmini iyonlaşma sabiti hesaplayan Chemicalize programıyla hesaplanmıştır.

4.1. Bileşiklerin Chemicalize ile Hesaplanmış İyonlaşma Sabitleri

Çalışılan tetrasiklin grubu bileşikler için C3' e bağlı olan OH grubuna ait pK_{a1} (konjuge trion sistem); C12' ye bağlı olan OH grubuna ait pK_{a2} (fenolik enon sistem); C4' e bağlı dimetilaminoya ait pK_{a3} değerleri Chemicalize programıyla hesaplanmıştır (Şekil 4.1, Çizelge 4.1). Bileşiklerin epimerlerinden yapısal olarak farkı sadece 4 numaralı C üzerindeki H ve N(CH₃)₂' nin yerdeğiştirmesi olduğundan epimerlerinin pK_a değerleride bileşiklerinin pK_a değerleriyle aynı şekilde hesaplanmıştır. Bu yüzden epimerlerin Chemicalize değerleri Çizelge 4.1' de verilmemiştir.



Şekil 4.1. Tetrasiklinin genel yapısı

Çizelge 4.1. Tetrasiklin ve epimerlerinin Chemicalize ile hesaplanmış tahmini pK_a değerleri

Bileşikler	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a3}
Tetrasiklin	2,92	7,61	8,19
Oksitetrasiklin	2,84	7,24	7,38
Klortetrasiklin	2,65	7,24	8,55

4.2. Bileşiklerin RPLC Yöntemiyle Farklı Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabitlerinin Tayini

Bu tez çalışmasında bileşiklerin asidik iyonlaşma sabitlerinin tayini % 20, %25 ve %30 (v/v) asetonitril:su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir asetonitril-su ikili karışımında farklı pH değerleri 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8 olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Çalışılan her bir pH değerinde bileşiklerin tayin edilen alıkonma değerleri kullanılarak lineer solvasyon enerji bağıntısı (LSER) yaklaşımıyla t_R değerleri hesaplanmıştır. Alıkonma hesaplanmasında her bir mobil faz pH değeri ve bileşiklerin hesaplanmış iyonlaşma dereceleri (D) kullanılmıştır. Ayrıca bu çalışmada termodinamik pK_a değerlerinin hesaplanması amaçlandığından bu yaklaşıma aktiflik katsayıları da ilave edilmiştir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde oluşan doğrunun doğrusal olduğu, eğim değerinin 1 ve kesim değerinin 0 veya sıfıra yakın olduğu belirlenmiştir. Daha sonra deneysel ve hesaplanan değerler arasındaki farkların toplamı kullanılarak Solver (Çözücü) ile çözdürülmüş ve pK_a değeri hesaplanmıştır.

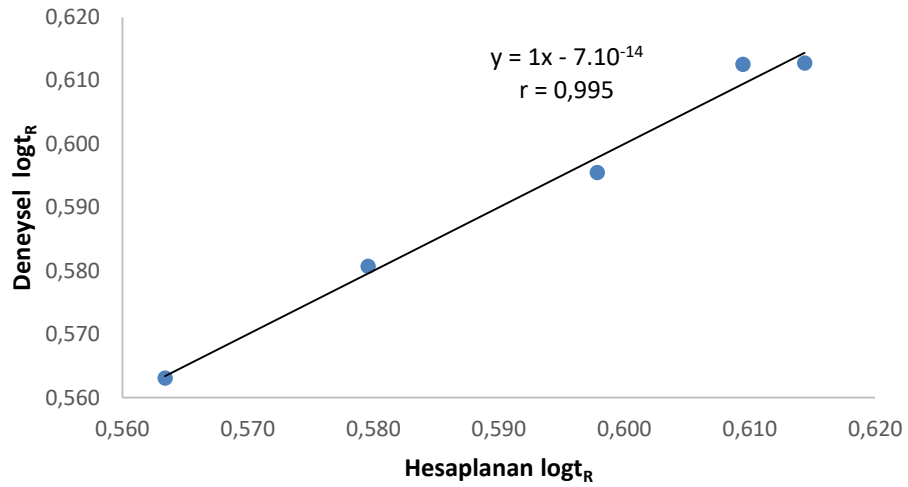
4.2.1. Tetrasiklin için Sıvı Kromatografik Veriler

Tetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.2' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir. Böylece aktiflik katsayıları da hesaplamaya dahil edilerek bileşiklerin termodinamik pK_a verileri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.2. Tetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ aktiflik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
3	4,100	0,854	0,614	0,613	0,0000025
3,5	4,098	0,832	0,609	0,613	0,0000097
4	3,940	0,823	0,598	0,595	0,0000055
4,5	3,808	0,819	0,580	0,581	0,0000013
5	3,657	0,818	0,563	0,563	0,0000001
				Toplam	0,000019

Çizelge incelendiğinde tetrasiklinin pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.2' de verilmiştir.



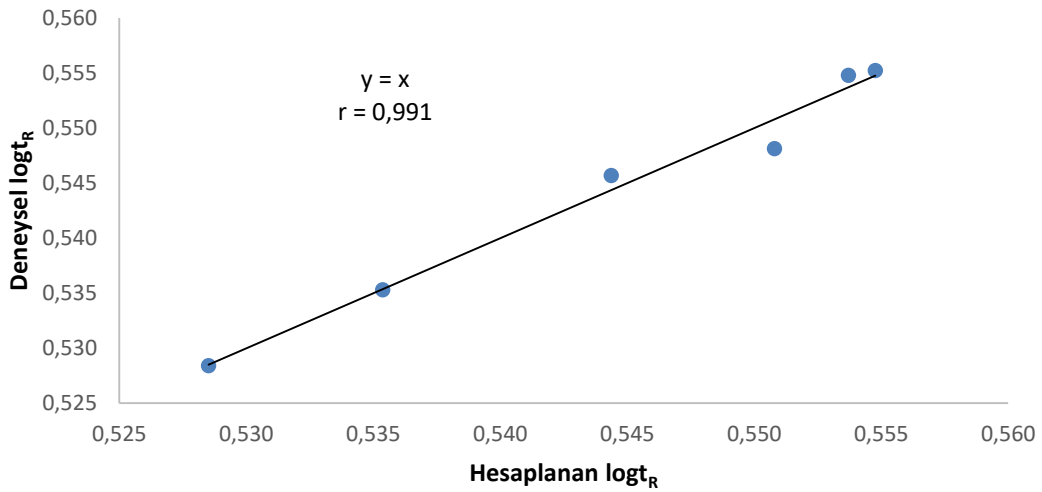
Şekil 4.2. Tetrasiklin için % 30 asetonitril: su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. Tetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.3' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.3. Tetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

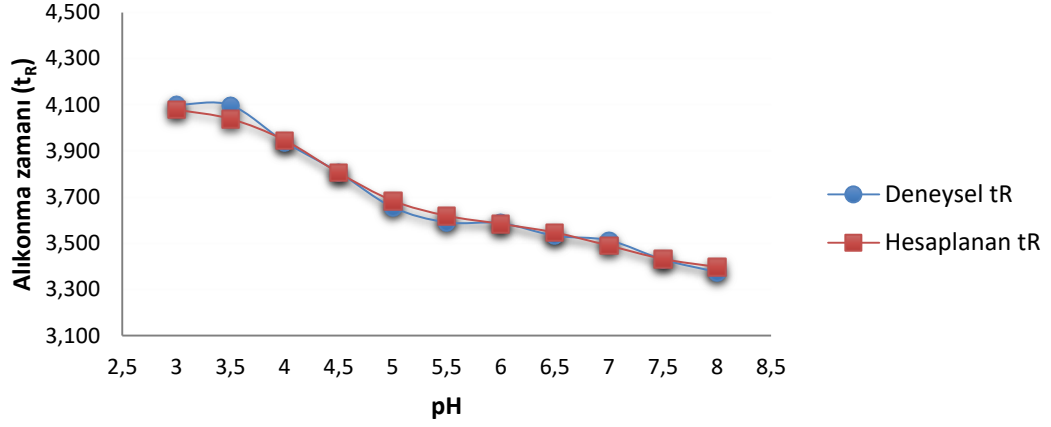
pH	Deneysel t_R	γ aktivlik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	3,591	0,817	0,555	0,555	0,000000202
6	3,588	0,816	0,554	0,555	0,000001160
6,5	3,533	0,813	0,551	0,548	0,000007058
7	3,513	0,805	0,544	0,546	0,000001715
7,5	3,430	0,788	0,535	0,535	0,000000005
8	3,376	0,767	0,529	0,528	0,000000011
				Toplam	0,000010

Çizelge incelendiğinde tetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.3' de verilmiştir.



Şekil 4.3. Tetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Ayrıca mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.4' de verilmiştir.



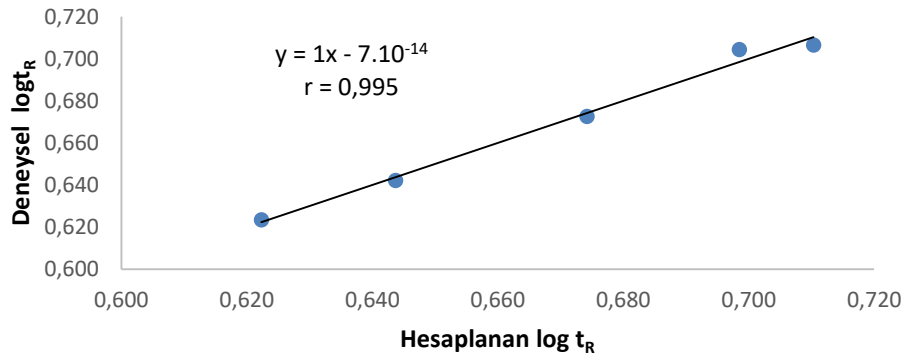
Şekil 4.4. Tetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH- alıkonma zamanı ilişkisi

Tetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.4' de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Tetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneyssel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneyssel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
3	5,088	0,851	0,710	0,707	0,000014
3,5	5,063	0,834	0,699	0,704	0,000035
4	4,706	0,828	0,674	0,673	0,000003
4,5	4,386	0,825	0,644	0,642	0,000003
5	4,201	0,824	0,622	0,623	0,000001
				Toplam	0,000006

Çizelge incelendiğinde tetrasiklinin %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneyssel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneyssel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.5' de verilmiştir.



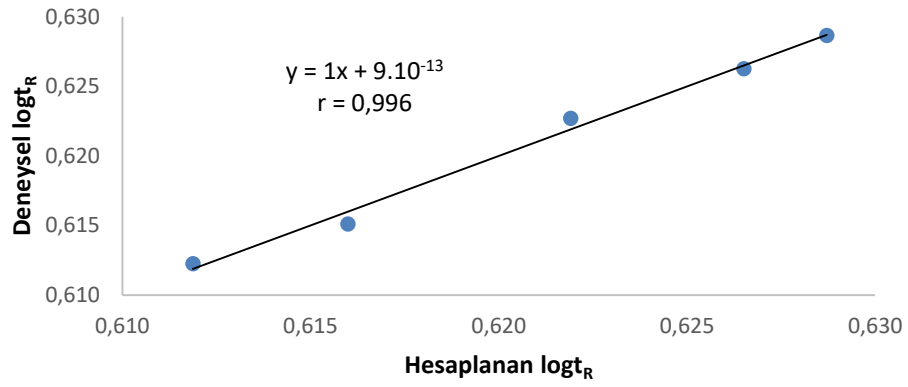
Şekil 4.5. Tetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. Tetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 6-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.5' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.5. Tetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 6,0-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

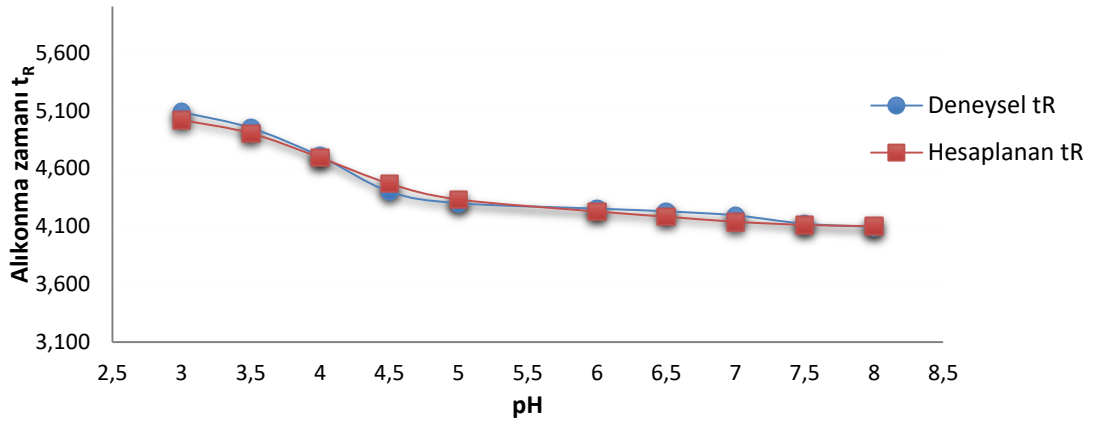
pH	Deneysel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
6	4,253	0,822	0,629	0,629	0,000000002
6,5	4,229	0,818	0,627	0,626	0,000000057
7	4,195	0,808	0,622	0,623	0,000000628
7,5	4,122	0,790	0,616	0,615	0,000000785
8	4,095	0,770	0,612	0,612	0,000000144
				Toplam	0,000002

Çizelge incelendiğinde tetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.6' da verilmiştir.



Şekil 4.6. Tetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 6,0-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

% 25 asetonitril:su ikili karışımında, mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.7' de verilmiştir.



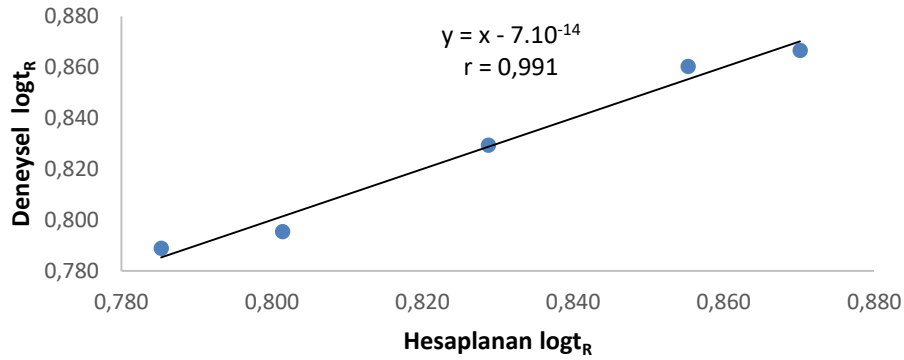
Şekil 4.7. Tetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında pH- alıkonma zamanı ilişkisi

Tetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.6' da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Tetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ aktiflik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
3	7,357	0,850	0,870	0,867	0,000012
3,5	7,251	0,837	0,855	0,860	0,000026
4	6,753	0,832	0,829	0,829	0,000001
4,5	6,2435	0,831	0,801	0,795	0,000036
5	6,15	0,830	0,785	0,789	0,000013
				Toplam	0,00009

Çizelge incelendiğinde tetrasiklinin %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.8' de verilmiştir.



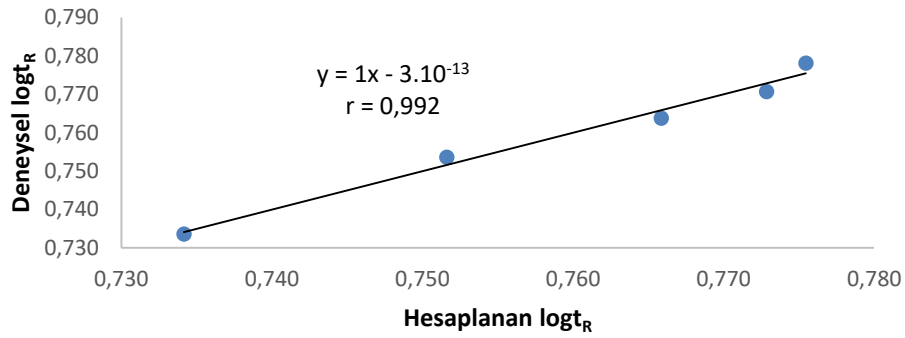
Şekil 4.8. Tetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. Tetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-7,5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.7' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.7. Tetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-7,5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

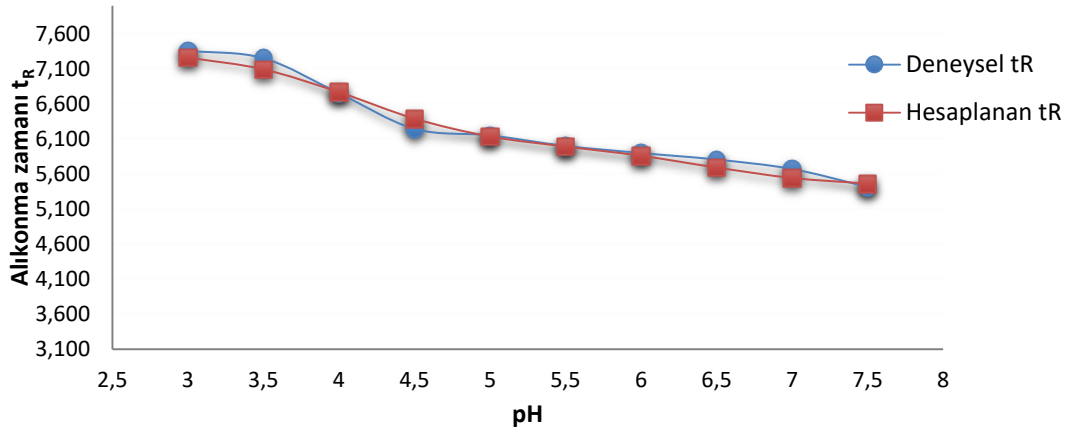
pH	Deneyssel t_R	γ aktivlik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneyssel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	6,000	0,829	0,775	0,778	0,0000073
6	5,899	0,827	0,773	0,771	0,0000044
6,5	5,805	0,822	0,766	0,764	0,0000042
7	5,671	0,810	0,752	0,754	0,0000040
7,5	5,415	0,791	0,734	0,734	0,0000003
				Toplam	0,00002

Çizelge incelendiğinde tetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneyssel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneyssel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.9' da verilmiştir.



Şekil 4.9. Tetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, 5,5-7,5 arasındaki deneyssel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

% 20 asetonitril:su ikili karışımında, mobil faz pH değerleri, deneyssel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.10' da verilmiştir.



Şekil 4.10. Tetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında pH- alıkonma zamanı ilişkisi

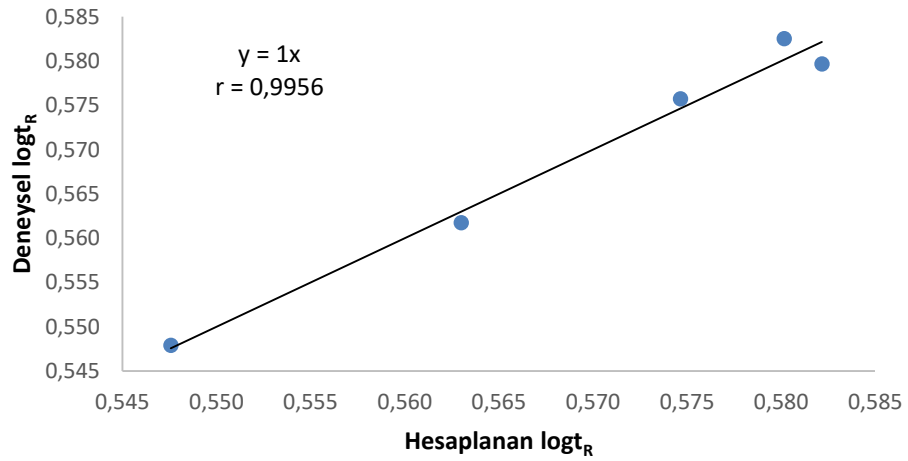
4.2.2. 4-epitetrasiklin için Sıvı Kromatografik Veriler

4-epitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.8' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir. Böylece aktiflik katsayıları da hesaplamaya dahil edilerek bileşiklerin termodinamik pK_a verileri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.8. 4-epitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneyssel t _R	γ aktiflik	Hesaplanan logt _R	Deneyssel logt _R	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
3	3,799	0,854	0,582	0,580	0,0000062
3,5	3,824	0,832	0,580	0,583	0,0000056
4	3,765	0,823	0,575	0,576	0,0000011
4,5	3,645	0,819	0,563	0,562	0,0000016
5	3,531	0,818	0,548	0,548	0,0000001
				Toplam	0,0000146

Çizelge incelendiğinde 4-epitetrasiklinin pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneyssel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbirini ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan logt_R ile deneyssel olarak bulunan logt_R grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.11' de verilmiştir.



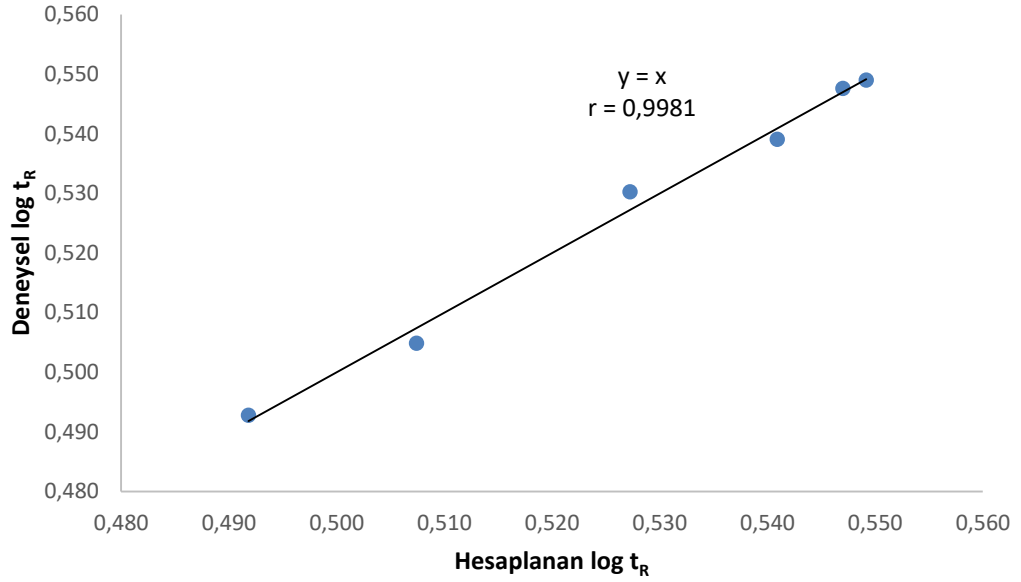
Şekil 4.11. 4-epitetrasiklin için % 30 asetonitril: su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan **logt_R** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. 4-epitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.9' da verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.9. 4-epitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

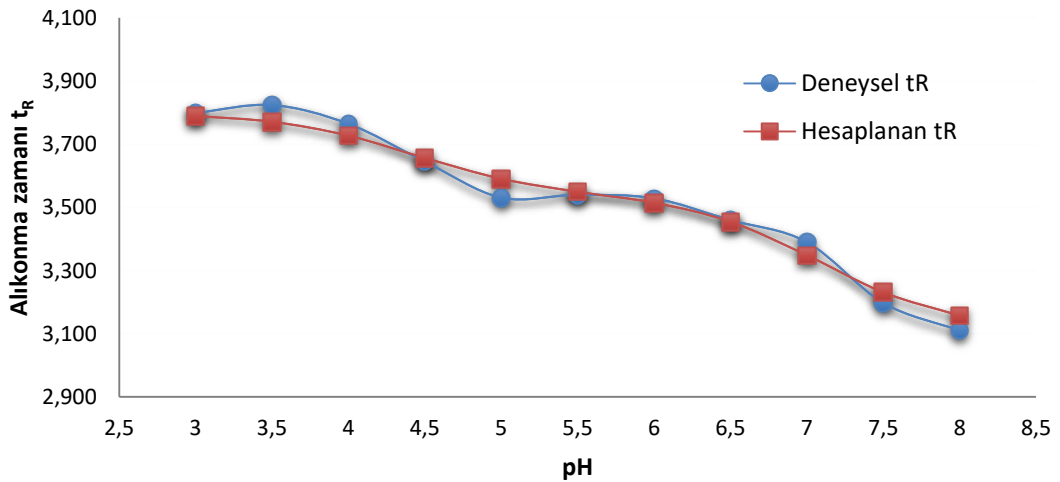
pH	Deneyisel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneyisel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	3,540	0,817	0,549	0,549	0,0000000
6	3,529	0,816	0,547	0,548	0,0000004
6,5	3,460	0,813	0,541	0,539	0,0000034
7	3,390	0,805	0,527	0,530	0,0000091
7,5	3,198	0,788	0,507	0,505	0,0000065
8	3,110	0,767	0,492	0,493	0,0000009
				Toplam	0,0000203

Çizelge incelendiğinde 4-epitetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.12' de verilmiştir.



Şekil 4.12. 4-epitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan **log t_R** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Ayrıca mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.13' de verilmiştir.



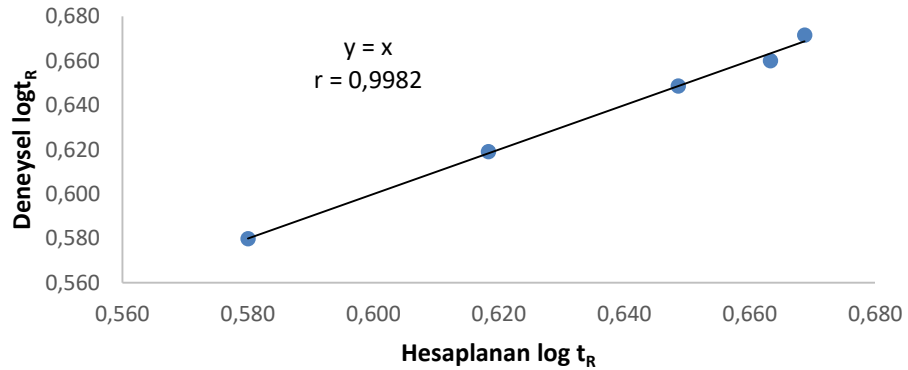
Şekil 4.13. 4-epitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH-alıkonma zamanı ilişkisi

4-epitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.10' da verilmiştir.

Çizelge 4.10. 4-epitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ aktiflik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
3	4,694	0,851	0,669	0,672	0,0000077
3,5	4,571	0,834	0,663	0,660	0,0000111
4	4,453	0,828	0,649	0,649	0,0000000
4,5	4,160	0,825	0,618	0,619	0,0000006
5	3,800	0,824	0,580	0,580	0,0000001
				Toplam	0,0000194

Çizelge incelendiğinde 4-epitetrasiklinin %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.14' de verilmiştir.



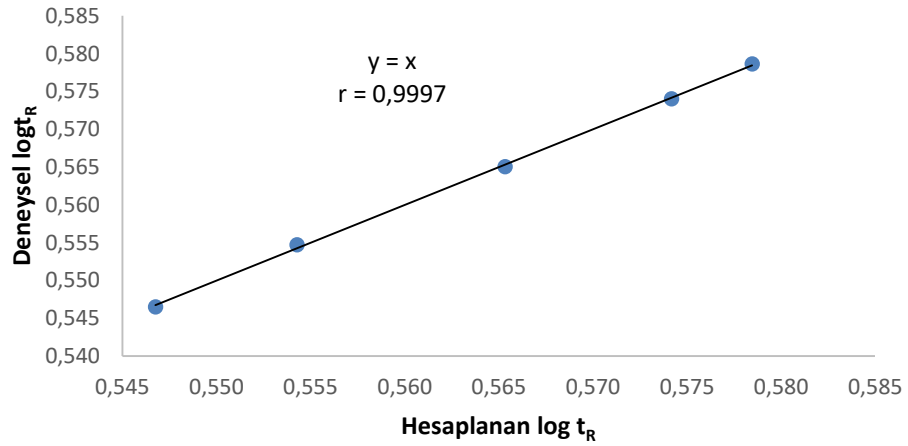
Şekil 4.14. 4-epitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. 4-epitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 6-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.11' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.11. 4-epitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 6,0-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

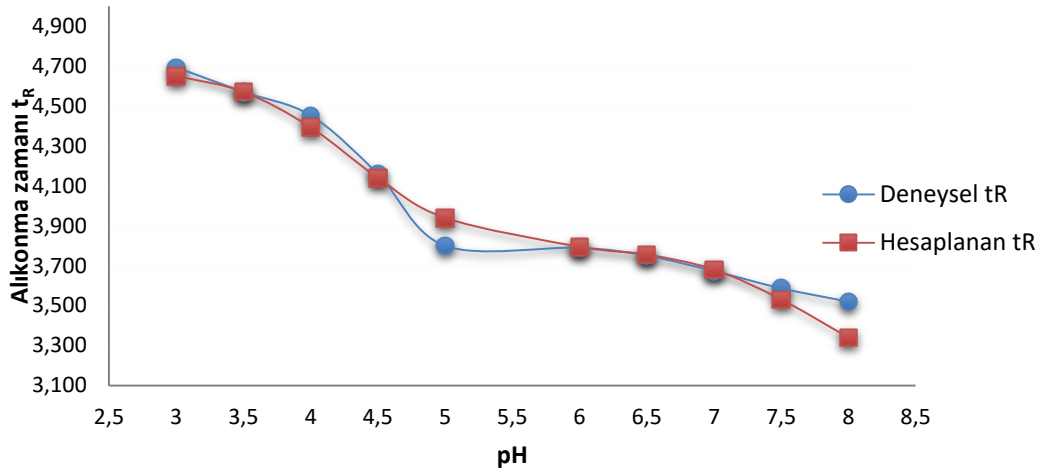
pH	Deneysel t_R	γ aktivlik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
6	3,790	0,822	0,578	0,579	0,0000004
6,5	3,750	0,818	0,574	0,574	0,0000034
7	3,673	0,808	0,565	0,565	0,0000091
7,5	3,587	0,790	0,554	0,555	0,0000065
8	3,520	0,770	0,547	0,547	0,0000009
				Toplam	0,0000203

Çizelge incelendiğinde 4-epitetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.15' de verilmiştir.



Şekil 4.15. 4-epitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 6,0-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

% 25 asetonitril:su ikili karışımında, mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.16' da verilmiştir.



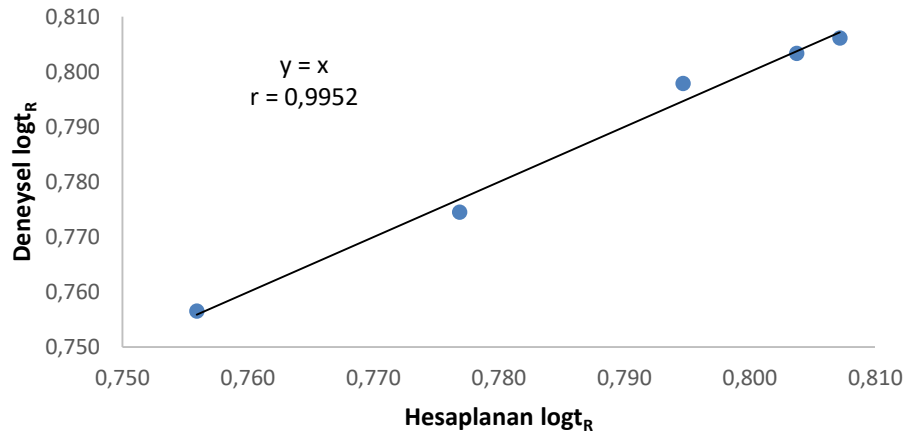
Şekil 4.16. 4-epitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH-alıkonma zamanı ilişkisi

4-epitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.12' de verilmiştir.

Çizelge 4.12. 4-epitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ aktiflik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
3	6,399	0,850	0,807	0,806	0,0000012
3,5	6,358	0,837	0,804	0,803	0,0000002
4	6,279	0,832	0,795	0,798	0,0000104
4,5	5,950	0,831	0,777	0,775	0,0000055
5	5,709	0,830	0,756	0,757	0,0000004
				Toplam	0,0000177

Çizelge incelendiğinde 4-epitetrasiklinin %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbirini ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.17' de verilmiştir.



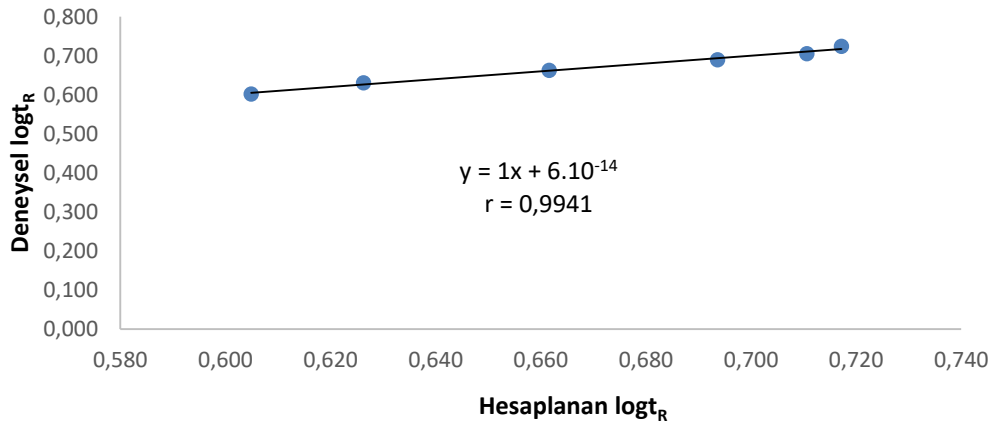
Şekil 4.17. 4-epitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. 4-epitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-7,8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.13' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.13. 4-epitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

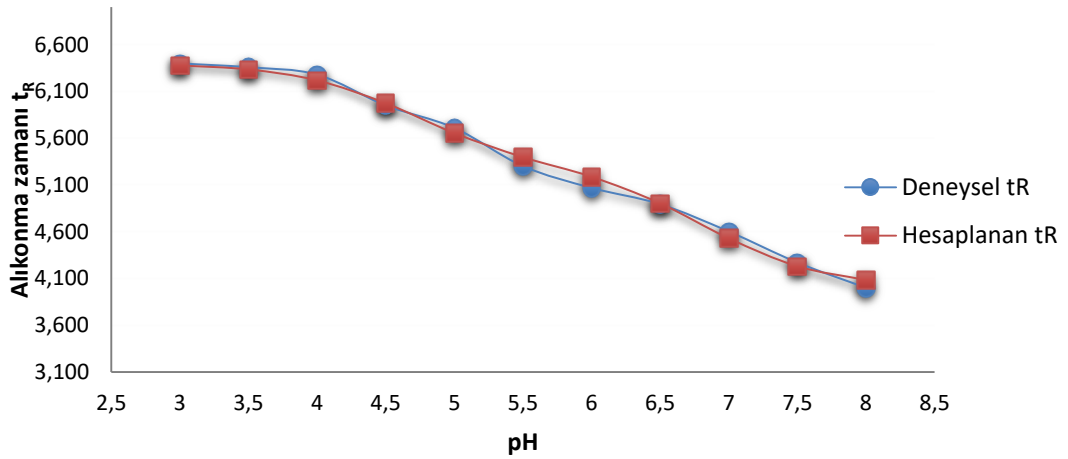
pH	Deneyisel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneyisel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	5,301	0,829	0,717	0,724	0,00005
6	5,068	0,827	0,711	0,705	0,00003
6,5	4,894	0,822	0,694	0,690	0,00002
7	4,602	0,810	0,662	0,663	0,00000
7,5	4,270	0,791	0,626	0,630	0,00002
8	4,000	0,773	0,605	0,602	0,00001
				Toplam	0,00013

Çizelge incelendiğinde 4-epitetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.18' de verilmiştir.



Şekil 4.18. 4-epitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, 5,5-8,0 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik.

% 20 asetonitril:su ikili karışımında, mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.19' da verilmiştir.



Şekil 4.19. 4-epitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında pH-alıkonma zamanı ilişkisi

4.2.3. Klortetrasiklin için Sıvı Kromatografik Veriler

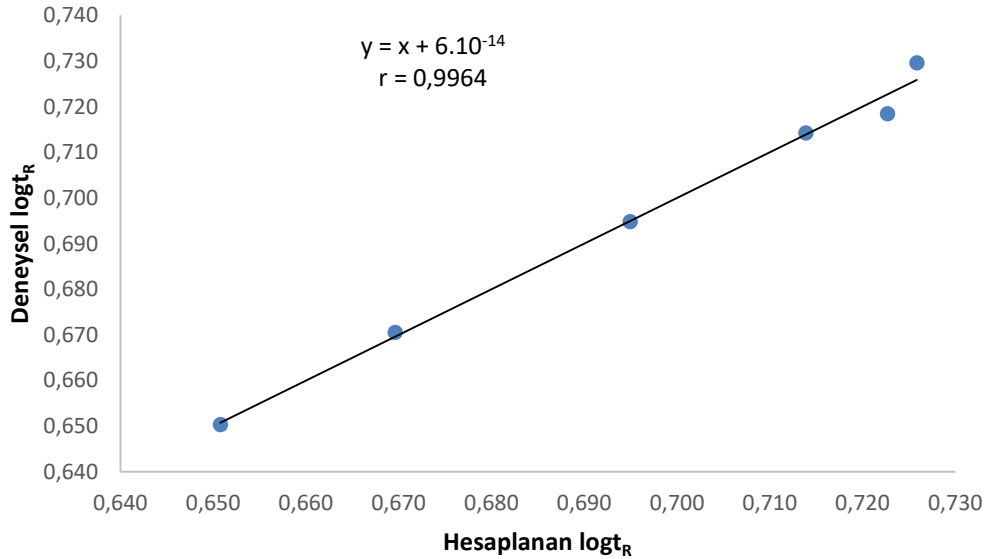
Klortetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.14' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir. Böylece aktiflik

katsayılarıda hesaplamaya dahil edilerek bileşiklerin termodinamik pK_a verileri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.14. Klortetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
2,5	5,365	0,888	0,726	0,730	0,000014
3	5,229	0,854	0,723	0,718	0,000018
3,5	5,179	0,832	0,714	0,714	0,000000
4	4,952	0,823	0,695	0,695	0,000000
4,5	4,683	0,819	0,670	0,671	0,000001
5	4,470	0,818	0,651	0,650	0,000000
				Toplam	0,000033

Çizelge incelendiğinde klortetrasiklinin pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.20' de verilmiştir.



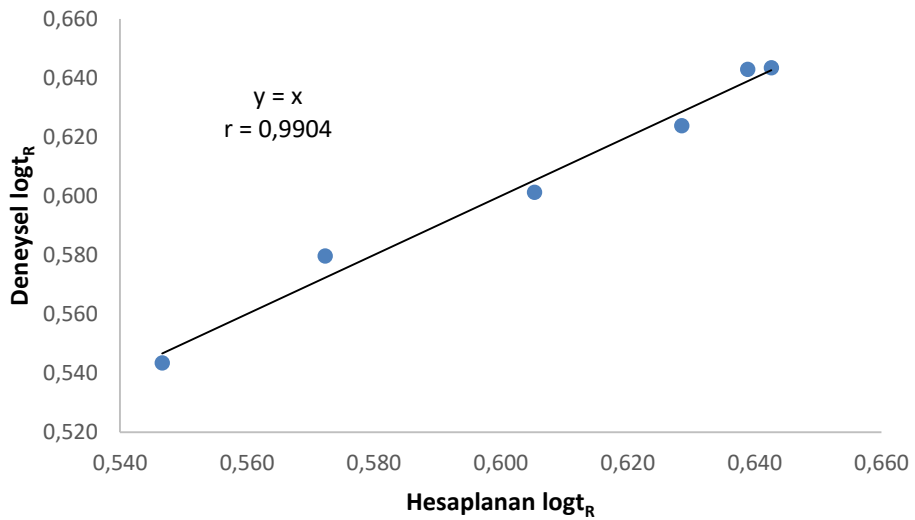
Şekil 4.20. Klortetrasiklin için % 30 asetonitril: su ikili karışımında, pH 2,5-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. Klortetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.15' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.15. Klortetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

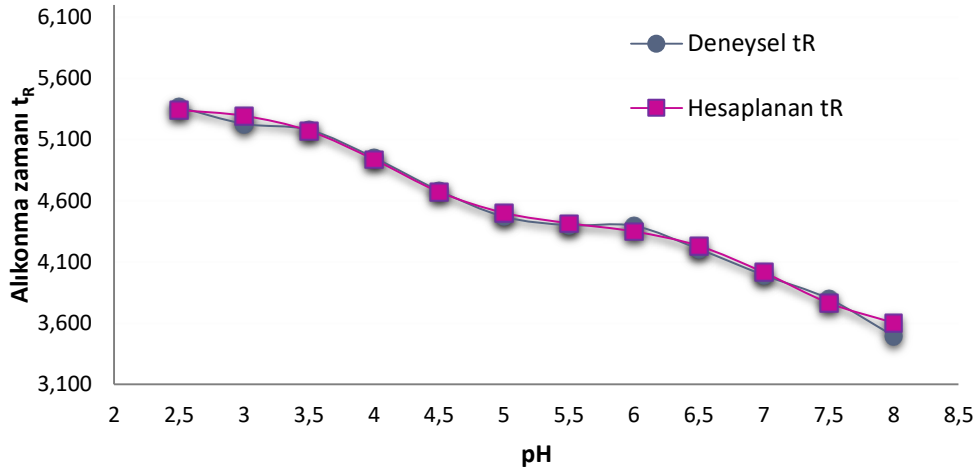
pH	Deneysel t_R	γ aktiflik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	4,400	0,817	0,643	0,643	0,000001
6	4,395	0,816	0,639	0,643	0,000016
6,5	4,205	0,813	0,629	0,624	0,000023
7	3,992	0,805	0,605	0,601	0,000017
7,5	3,799	0,788	0,572	0,580	0,000054
8	3,495	0,767	0,547	0,543	0,000010
				Toplam	0,000120

Çizelge incelendiğinde klortetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.21' de verilmiştir.



Şekil 4.21. Klortetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Ayrıca mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.22' de verilmiştir.



Şekil 4.22. Klortetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH- alıkonma zamanı ilişkisi

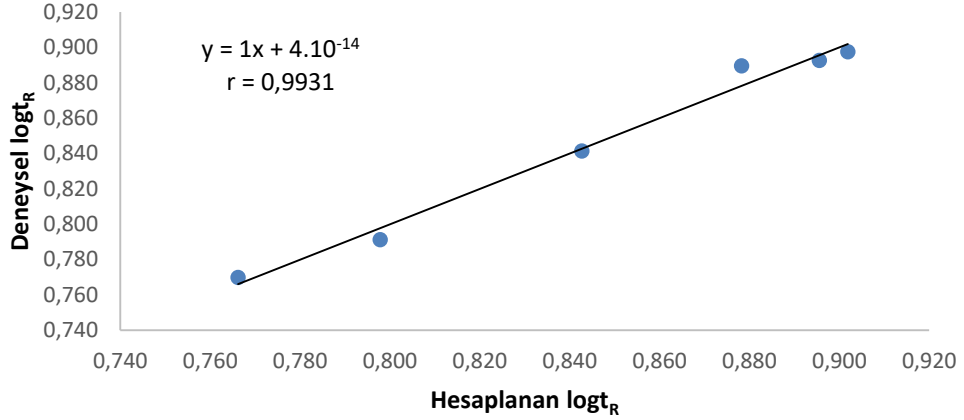
Klortetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.16' da verilmiştir.

Çizelge 4.16. Klortetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	$\gamma_{aktiflik}$	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
2,5	7,899	0,882	0,902	0,898	0,000019
3	7,810	0,851	0,896	0,893	0,000008
3,5	7,755	0,834	0,878	0,890	0,000128
4	6,942	0,828	0,843	0,841	0,000002
4,5	6,183	0,825	0,798	0,791	0,000044
5	5,888	0,824	0,766	0,770	0,000014
				Toplam	0,000214

Çizelge incelendiğinde klortetrasiklinin %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbirine uyumlu olduğu görülmektedir.

Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.23' de verilmiştir.



Şekil 4.23. Klortetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 2,5-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

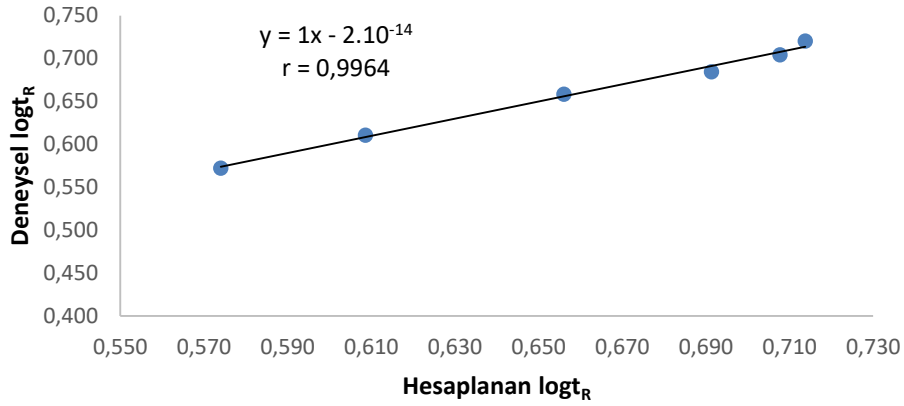
Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. Klortetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.17' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.17. Klortetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	5,254	0,824	0,714	0,720	0,000046
6	5,064	0,822	0,708	0,704	0,000011
6,5	4,838	0,818	0,691	0,685	0,000045
7	4,555	0,808	0,656	0,658	0,000006
7,5	4,083	0,790	0,609	0,611	0,000006
8	3,736	0,770	0,574	0,572	0,000003
				Toplam	0,000115

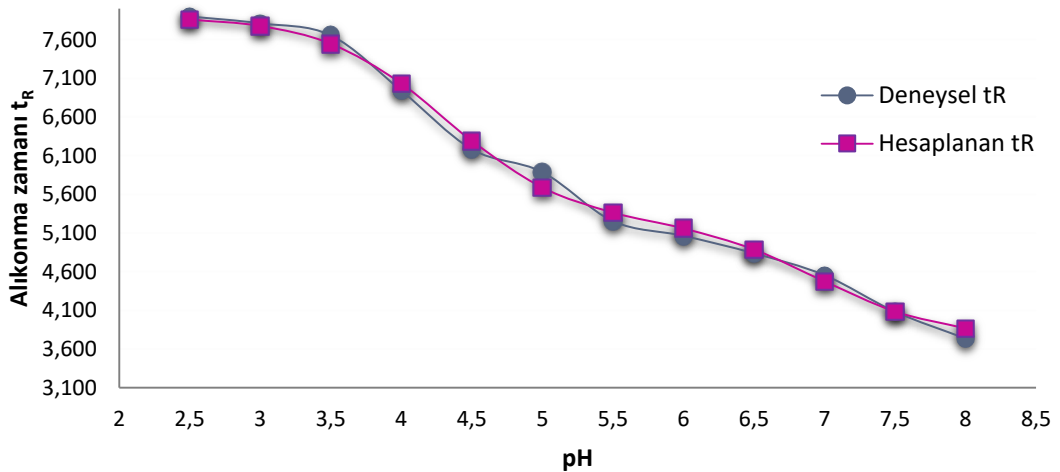
Çizelge incelendiğinde klortetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe

geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.24' de verilmiştir.



Şekil 4.24. Klortetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

% 25 asetonitril:su ikili karışımında, mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.25' de verilmiştir.



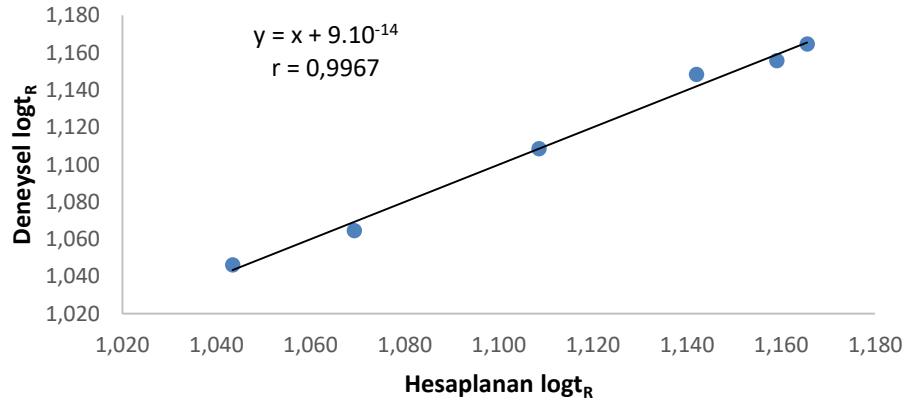
Şekil 4.25. Klortetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında pH- alıkonma zamanı ilişkisi

Klortetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.18' de verilmiştir.

Çizelge 4.18. Klortetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
2,5	14,610	0,876	1,166	1,165	0,000001
3	14,312	0,850	1,159	1,156	0,000011
3,5	14,071	0,837	1,142	1,148	0,000040
4	12,838	0,832	1,109	1,108	0,000000
4,5	11,600	0,831	1,069	1,064	0,000023
5	11,122	0,830	1,043	1,046	0,000008
				Toplam	0,000083

Çizelge incelendiğinde klortetrasiklinin %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.26' da verilmiştir.



Şekil 4.26. Klortetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, pH 2,5-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

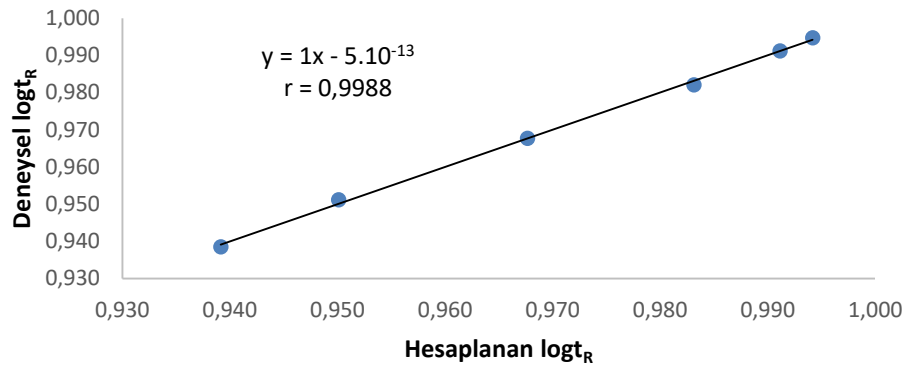
Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. Klortetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8,0

aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.19' da verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.19. Klortetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8,0 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

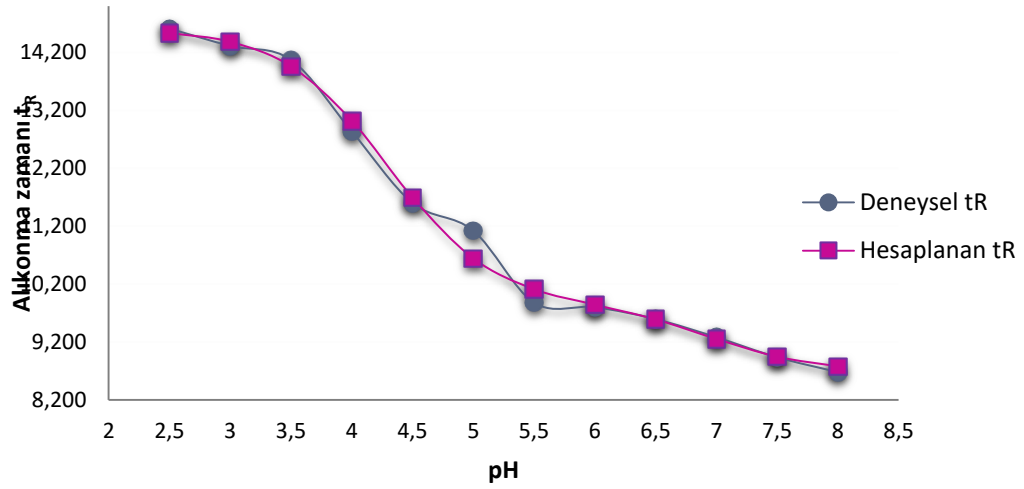
pH	Deneysel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	9,880	0,829	0,994	0,995	0,0000003
6	9,800	0,827	0,991	0,991	0,0000000
6,5	9,595	0,822	0,983	0,982	0,0000012
7	9,282	0,810	0,968	0,968	0,0000000
7,5	8,937	0,791	0,950	0,951	0,0000011
8	8,680	0,773	0,939	0,939	0,0000004
				Toplam	0,0000030

Çizelge incelendiğinde klortetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.27' de verilmiştir.



Şekil 4.27. Klortetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, 5,5-8,0 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

% 20 asetonitril:su ikili karışımında, mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.28' de verilmiştir.



Şekil 4.28. Klortetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında pH- alıkonma zamanı ilişkisi

4.2.4. 4-epiklortetrasiklin için Sıvı Kromatografik Veriler

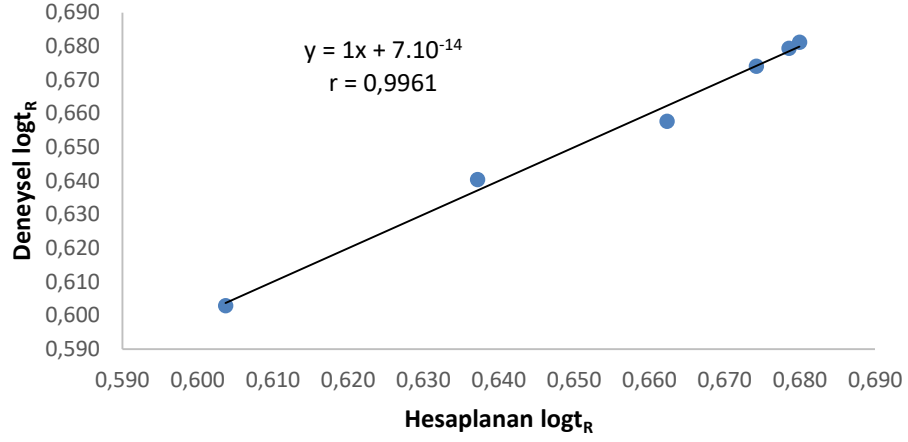
4-epiklortetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.20' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları (γ) verilmiştir. Böylece aktiflik katsayıları hesaplamaya dahil edilerek bileşiklerin termodinamik pK_a verileri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.20. 4-epiklortetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
2,5	4,800	0,888	0,680	0,681	0,000002
3	4,780	0,854	0,679	0,679	0,000001
3,5	4,722	0,832	0,674	0,674	0,000000
4	4,547	0,823	0,662	0,658	0,000021
4,5	4,370	0,819	0,637	0,640	0,000011
5	4,008	0,818	0,604	0,603	0,000001
				Toplam	0,000035

Çizelge incelendiğinde 4-epiklortetrasiklinin pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak

bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.29' da verilmiştir.



Şekil 4.29. 4-epiklortetrasiklin için % 30 asetonitril: su ikili karışımında, pH 2,5-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

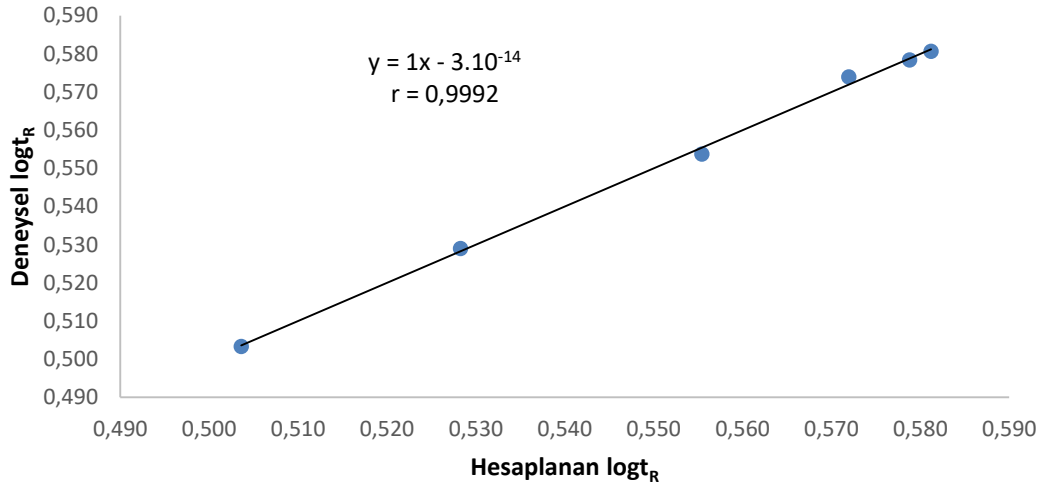
Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. 4-epiklortetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.21' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.21. 4-epiklortetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	3,808	0,817	0,581	0,581	0,0000003
6	3,788	0,816	0,579	0,578	0,0000002
6,5	3,749	0,813	0,572	0,574	0,0000040
7	3,579	0,805	0,555	0,554	0,0000027
7,5	3,381	0,788	0,528	0,529	0,0000006
8	3,187	0,767	0,504	0,503	0,0000000
				Toplam	0,0000078

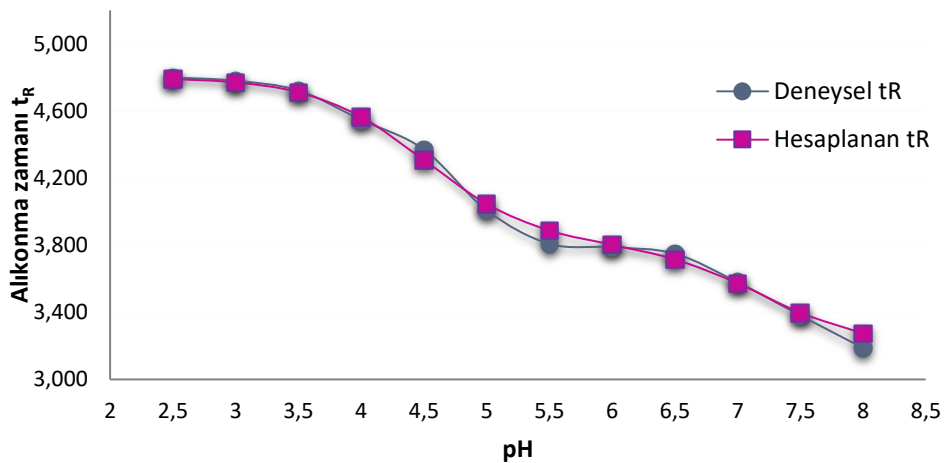
Çizelge incelendiğinde 4-epiklortetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$

grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.30' da verilmiştir.



Şekil 4.30. 4-epiklortetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Ayrıca mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.31' de verilmiştir.



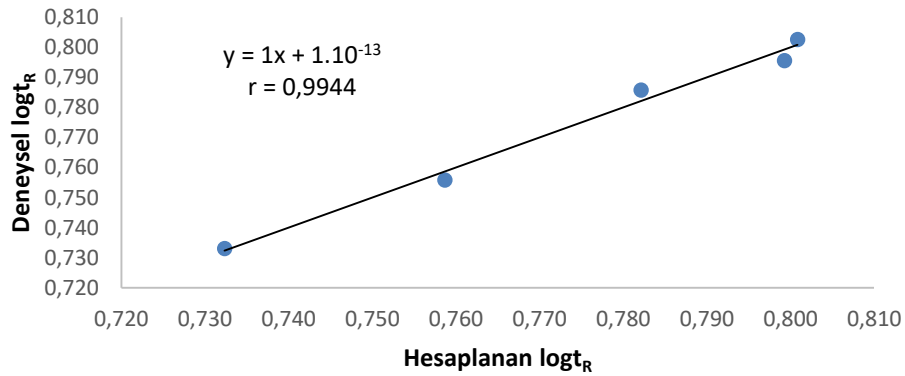
Şekil 4.31. 4-epiklortetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH-alıkonma zamanı ilişkisi

4-epiklortetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.22' de verilmiştir.

Çizelge 4.22. 4-epiklortetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ aktiflik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
2,5	6,349	0,882	0,801	0,803	0,000003
3	6,247	0,851	0,799	0,796	0,000013
4	6,107	0,828	0,782	0,786	0,000014
4,5	5,700	0,825	0,759	0,756	0,000008
5	5,409	0,824	0,732	0,733	0,000001
				Toplam	0,000038

Çizelge incelendiğinde 4-epiklortetrasiklinin %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.32' de verilmiştir.



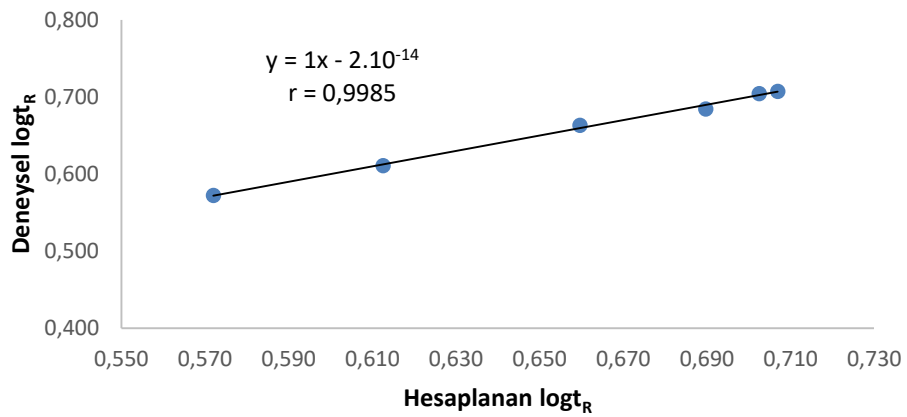
Şekil 4.32. 4-epiklortetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 2,5-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. 4-epiklortetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.23' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.23. 4-epiklortetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

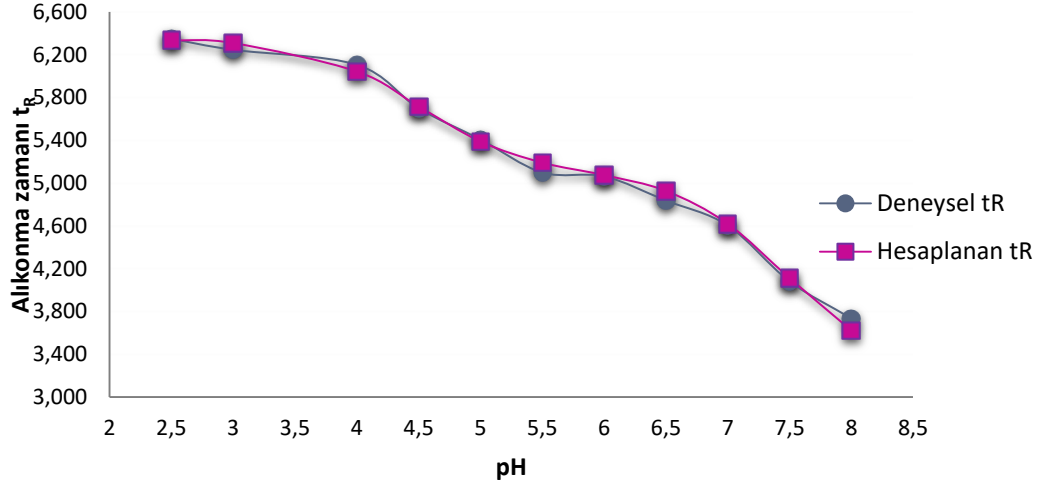
pH	Deneysel t_R	γ aktivlik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	5,100	0,824	0,707	0,708	0,0000004
6	5,064	0,822	0,702	0,704	0,0000039
6,5	4,838	0,818	0,690	0,685	0,0000256
7	4,605	0,808	0,660	0,663	0,0000129
7,5	4,083	0,790	0,613	0,611	0,0000023
8	3,736	0,770	0,572	0,572	0,0000001
				Toplam	0,0000452

Çizelge incelendiğinde 4-epiklortetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.33' de verilmiştir.



Şekil 4.33. 4-epiklortetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

% 25 asetonitril:su ikili karışımında, mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.34' de verilmiştir.



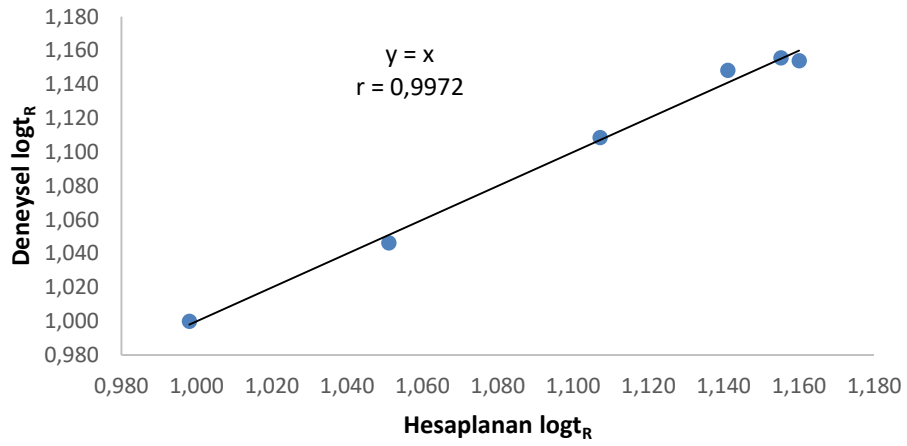
Şekil 4.34. 4-epiklortetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında pH-alıkonma zamanı ilişkisi

4-epiklortetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.24' de verilmiştir.

Çizelge 4.24. 4-epiklortetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 2,5-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneyisel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneyisel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
2,5	14,252	0,876	1,160	1,154	0,000038
3	14,312	0,850	1,155	1,156	0,000000
3,5	14,071	0,837	1,141	1,148	0,000052
4	12,838	0,832	1,107	1,108	0,000002
4,5	11,124	0,831	1,051	1,046	0,000023
5	10,000	0,830	0,998	1,000	0,000004
				Toplam	0,000118

Çizelge incelendiğinde 4-epiklortetrasiklinin %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneyisel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneyisel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.35' de verilmiştir.



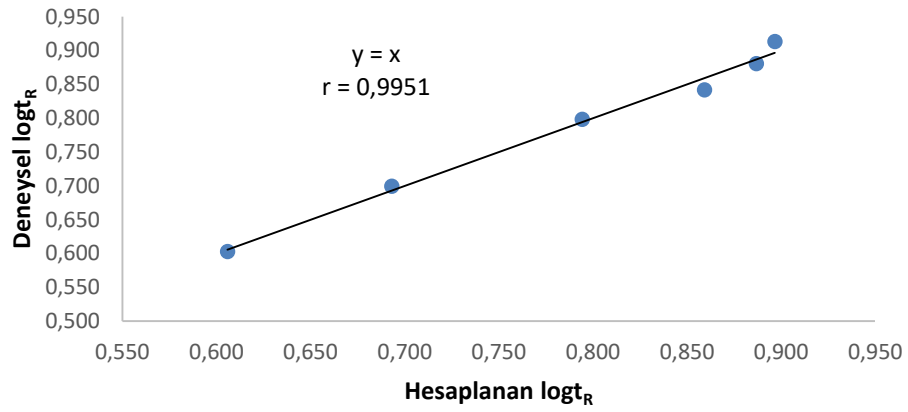
Şekil 4.35. 4-epiklortetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, pH 2,5-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. 4-epiklortetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.25' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.25. 4-epiklortetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8,0 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

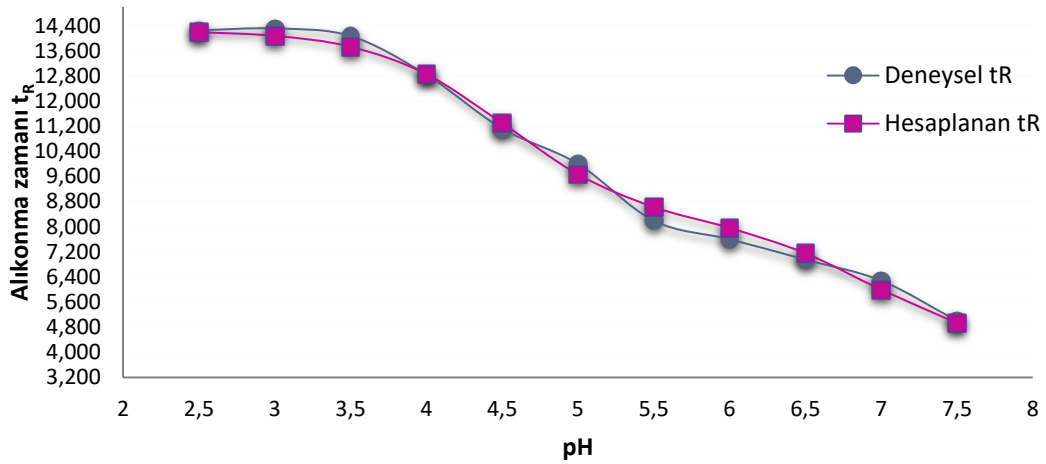
pH	DeneySEL t_R	γ aktiflik	Hesaplanan $\log t_R$	DeneySEL $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	8,190	0,829	0,897	0,913	0,00028
6	7,600	0,827	0,887	0,881	0,00004
6,5	6,950	0,822	0,859	0,842	0,00030
7	6,281	0,810	0,794	0,798	0,00001
7,5	5,003	0,791	0,693	0,699	0,00004
8	4,005	0,773	0,606	0,603	0,00001
				Toplam	0,00067

Çizelge incelendiğinde 4-epiklortetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.36' da verilmiştir.



Şekil 4.36. 4-epiklortetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, 5,5-8,0 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

% 20 asetonitril:su ikili karışımında, mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.37' de verilmiştir.



Şekil 4.37. 4-epiklortetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında pH-alıkonma zamanı ilişkisi

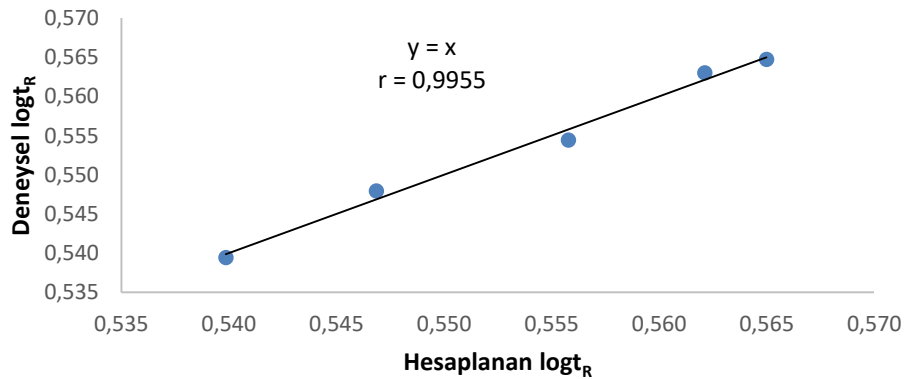
4.2.5. Oksitetrasiklin için Sıvı Kromatografik Veriler

Oksitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3,0-5,0 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.26' da verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir. Böylece aktiflik katsayıları da hesaplamaya dahil edilerek bileşiklerin termodinamik pK_a verileri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.26. Oksitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 3,0-5,0 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
3	3,671	0,854	0,565	0,565	0,000000
3,5	3,656	0,832	0,562	0,563	0,000001
4	3,585	0,823	0,556	0,554	0,000002
4,5	3,531	0,819	0,547	0,548	0,000001
5	3,463	0,818	0,540	0,539	0,000000
				Toplam	0,000004

Çizelge incelendiğinde oksitetrasiklinin pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.38' de verilmiştir.



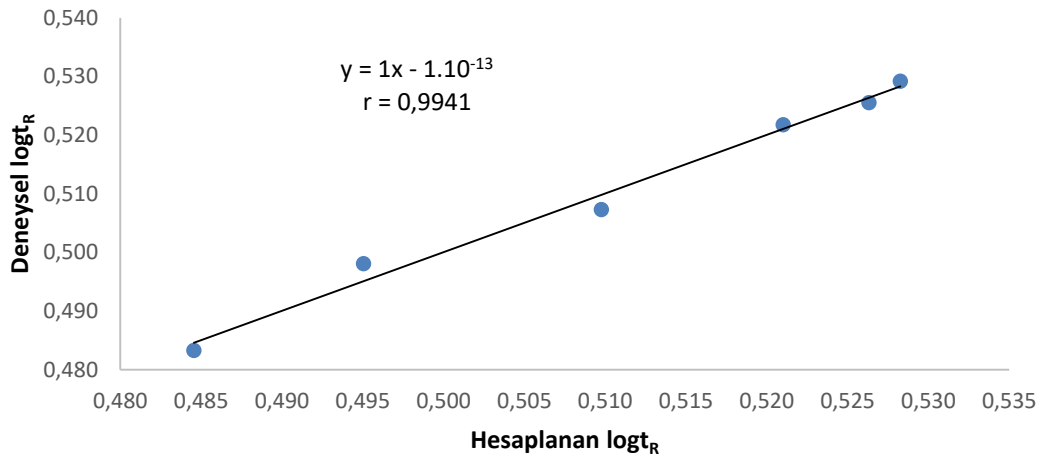
Şekil 4.38. Oksitetrasiklin için % 30 asetonitril: su ikili karışımında, pH 3,0-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. Oksitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.27' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.27. Oksitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

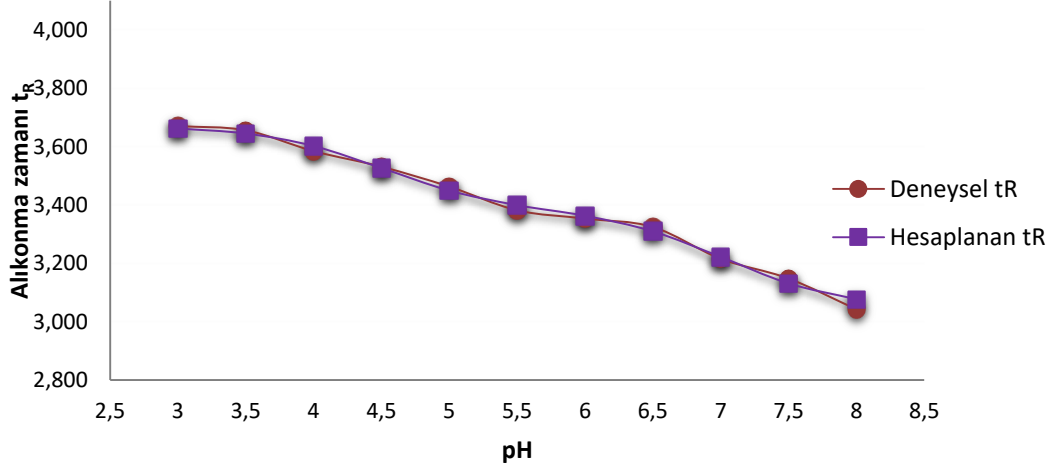
pH	Deneysel t_R	γ aktiflik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	3,382	0,817	0,528	0,529	0,000001
6	3,354	0,816	0,526	0,525	0,000001
6,5	3,325	0,813	0,521	0,522	0,000001
7	3,216	0,805	0,510	0,507	0,000006
7,5	3,148	0,788	0,495	0,498	0,000009
8	3,043	0,767	0,485	0,483	0,000002
				Toplam	0,000019

Çizelge incelendiğinde oksitetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.39' da verilmiştir.



Şekil 4.39. Oksitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Ayrıca mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.40' da verilmiştir.



Şekil 4.40. Oksitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH- alıkonma zamanı ilişkisi

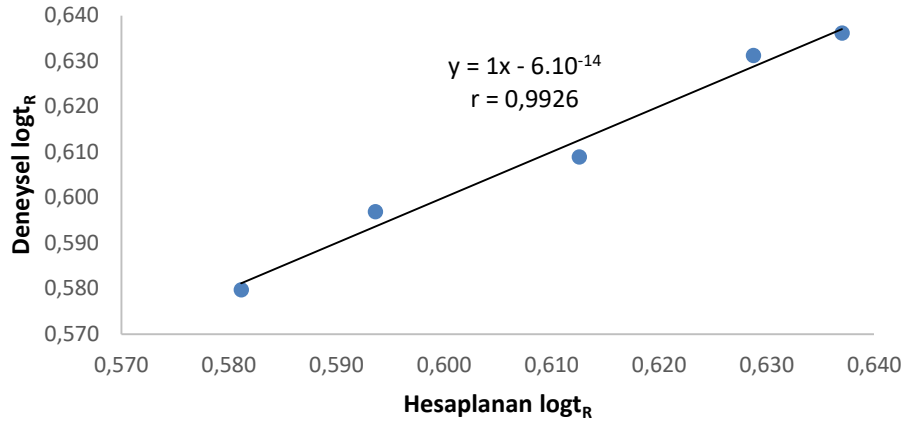
Oksitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3,0-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.28' de verilmiştir.

Çizelge 4.28. Oksitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3,0-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
3	4,327	0,851	0,637	0,636	0,00000
3,5	4,278	0,834	0,629	0,631	0,00001
4	4,064	0,828	0,613	0,609	0,00001
4,5	3,953	0,825	0,594	0,597	0,00001
5	3,800	0,824	0,581	0,580	0,00000
				Toplam	0,00003

Çizelge incelendiğinde oksitetrasiklinin %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde

edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.41' de verilmiştir.



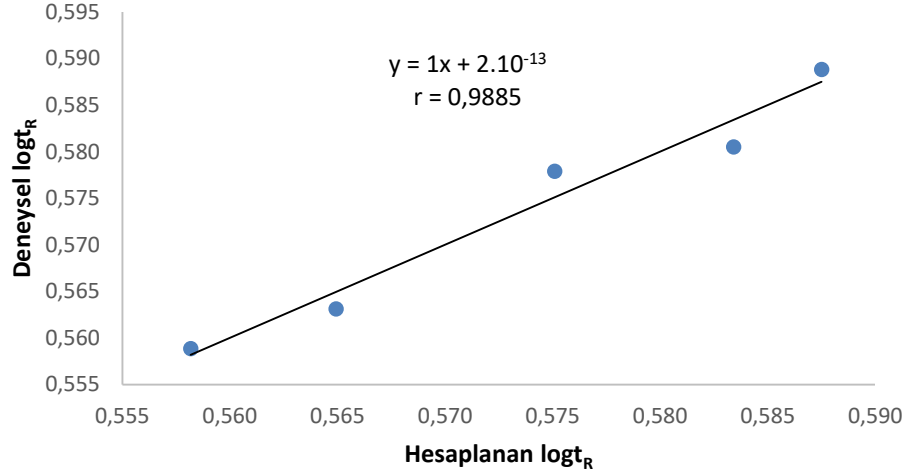
Şekil 4.41. Oksitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3,0-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. Oksitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 6,0-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.29' da verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.29. Oksitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 6,0-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

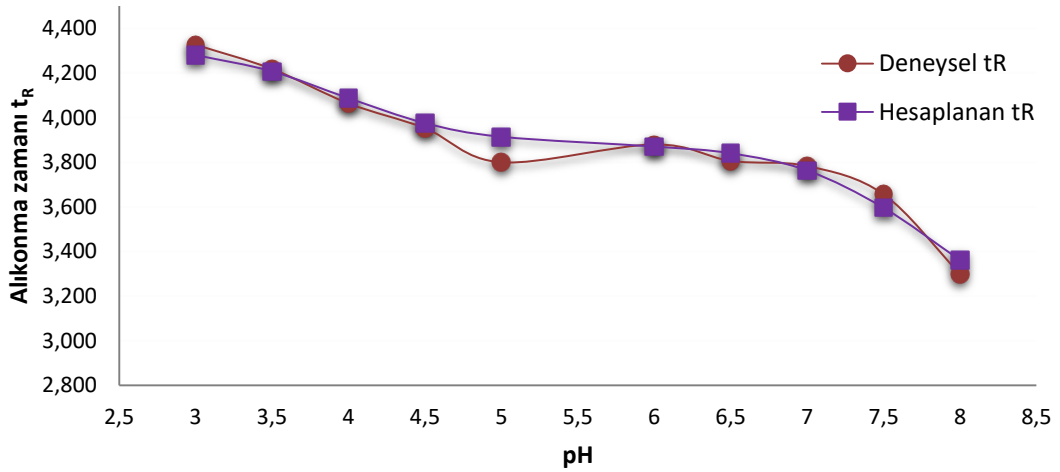
pH	DeneySEL t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	DeneySEL $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
6	3,880	0,822	0,588	0,589	0,000002
6,5	3,806	0,818	0,583	0,581	0,000008
7	3,783	0,808	0,575	0,578	0,000008
7,5	3,657	0,790	0,565	0,563	0,000003
8	3,621	0,770	0,558	0,559	0,000000
				Toplam	0,00002

Çizelge incelendiğinde oksitetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.42' de verilmiştir.



Şekil 4.42. Oksitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 6,0-8,0 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

% 25 asetonitril:su ikili karışımında, mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.43' de verilmiştir.



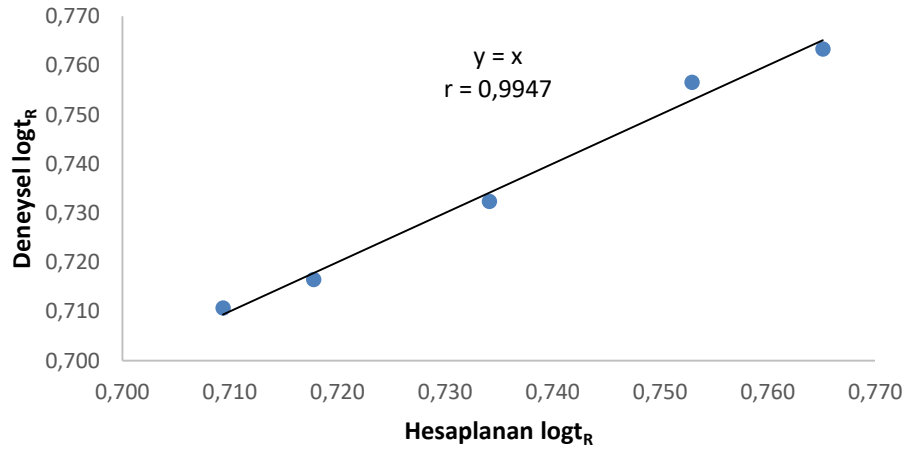
Şekil 4.43. Oksitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında pH- alıkonma zamanı ilişkisi

Oksitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3,0-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.30' da verilmiştir.

Çizelge 4.30. Oksitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
3	5,799	0,850	0,765	0,763	0,000003
3,5	5,709	0,837	0,753	0,757	0,000013
4	5,399	0,832	0,734	0,732	0,000003
4,5	5,206	0,831	0,718	0,716	0,000002
5	5,137	0,830	0,709	0,711	0,000002
				Toplam	0,000023

Çizelge incelendiğinde oksitetrasiklinin %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.44' de verilmiştir.



Şekil 4.44. Oksitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3,0-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

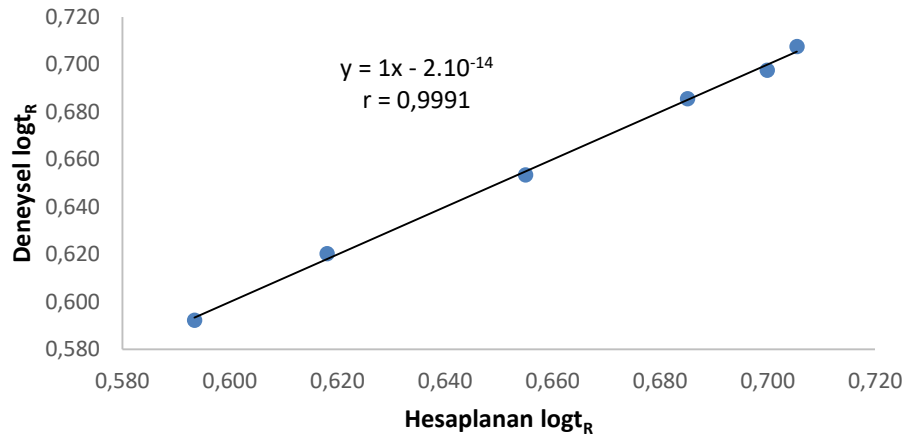
Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. Oksitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8

aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.31' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.31. Oksitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8,0 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	5,100	0,829	0,705	0,708	0,000004
6	4,984	0,827	0,700	0,698	0,000005
6,5	4,849	0,822	0,685	0,686	0,000000
7	4,503	0,810	0,655	0,653	0,000002
7,5	4,173	0,791	0,618	0,620	0,000006
8	3,911	0,773	0,593	0,592	0,000001
				Toplam	0,000019

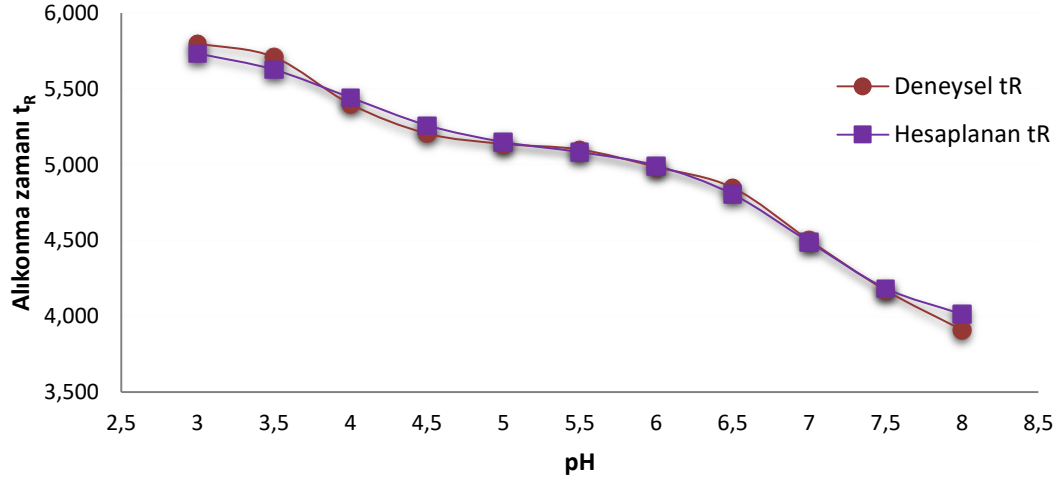
Çizelge incelendiğinde oksitetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.45' de verilmiştir.



Şekil 4.45. Oksitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

% 20 asetonitril:su ikili karışımında, mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş

Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.46' da verilmiştir.



Şekil 4.46. Oksitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında pH- alıkonma zamanı ilişkisi

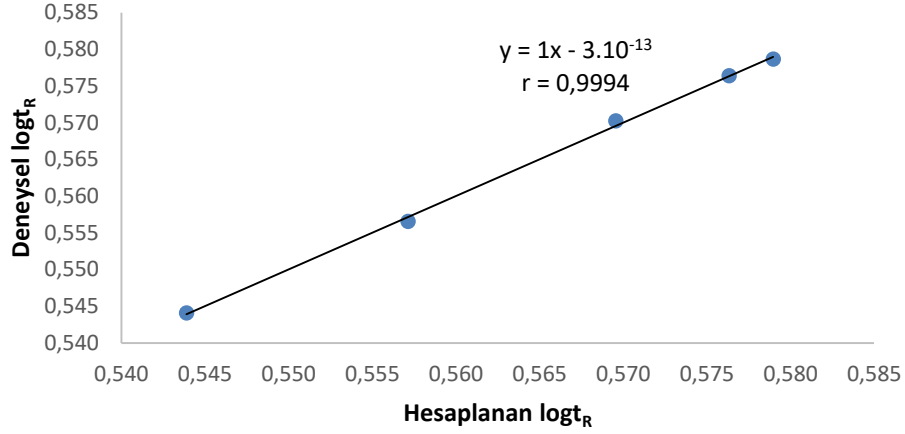
4.2.6. 4-epioksitetrasiklin için Sıvı Kromatografik Veriler

4-epioksitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3,0-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.32' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir. Böylece aktiflik katsayıları da hesaplamaya dahil edilerek bileşiklerin termodinamik pK_a verileri hesaplanmıştır.

Çizelge 4.32. 4-epioksitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneysel t_R	γ_{aktiflik}	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
3	3,790	0,854	0,579	0,579	0,00000011
3,5	3,770	0,832	0,576	0,576	0,00000000
4	3,717	0,823	0,570	0,570	0,00000047
4,5	3,602	0,819	0,557	0,557	0,00000035
5	3,500	0,818	0,544	0,544	0,00000003
				Toplam	0,000001

Çizelge incelendiğinde 4-epioksitetrasiklinin pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.47' de verilmiştir.



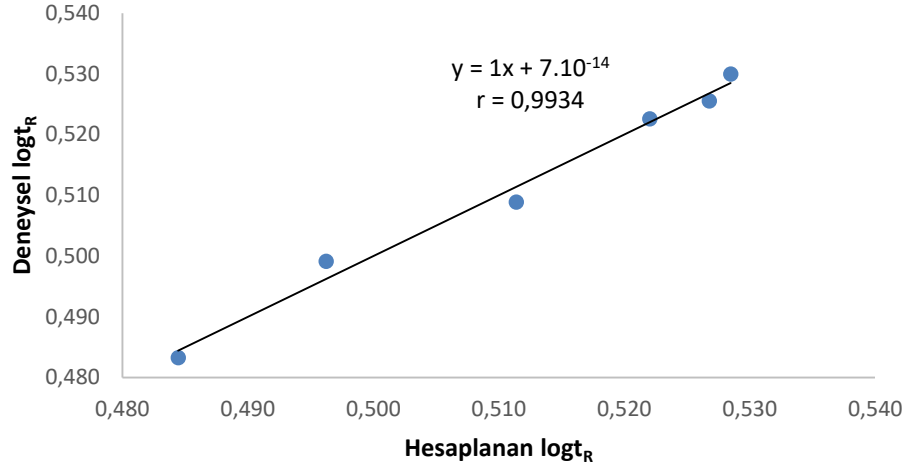
Şekil 4.47. 4-epioksitetrasiklin için % 30 asetonitril: su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. 4-epioksitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.33' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.33. 4-epioksitetrasiklin için %30 (v/v) asetonitril: su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

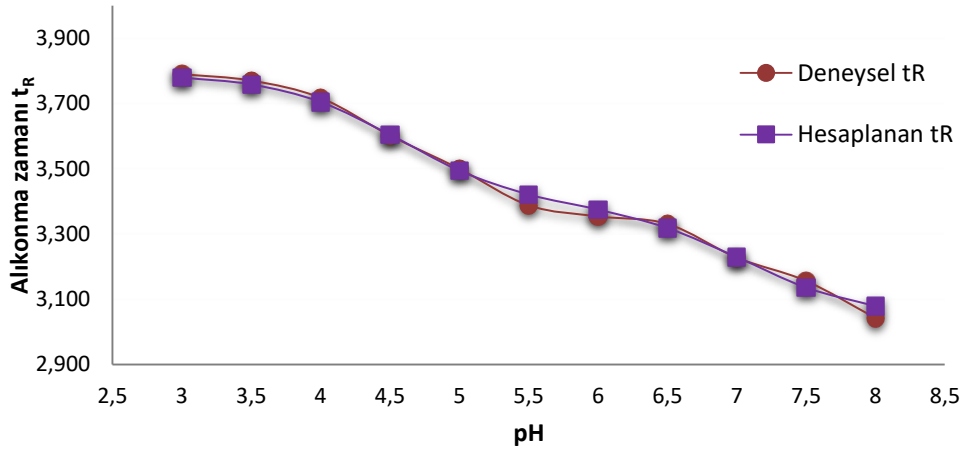
pH	Deneysel t_R	$\gamma_{aktiflik}$	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	3,388	0,817	0,528	0,530	0,000002
6	3,354	0,816	0,527	0,526	0,000001
6,5	3,331	0,813	0,522	0,523	0,000000
7	3,228	0,805	0,511	0,509	0,000006
7,5	3,156	0,788	0,496	0,499	0,000008
8	3,043	0,767	0,484	0,483	0,000001
				Toplam	0,000020

Çizelge incelendiğinde 4-epioksitetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.48' de verilmiştir.



Şekil 4.48. 4-epioksitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Ayrıca mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.49' da verilmiştir.



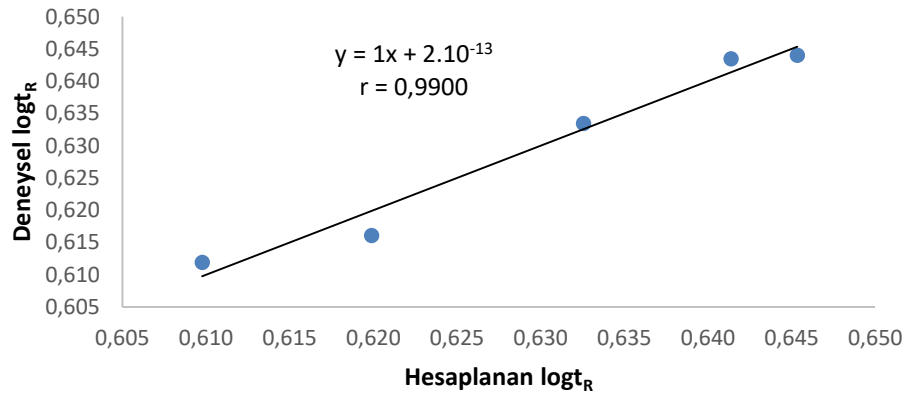
Şekil 4.49. 4-epioksitetrasiklin için % 30 asetonitril:su ikili karışımında pH-alıkonma zamanı ilişkisi

4-epioksitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.34' de verilmiştir.

Çizelge 4.34. 4-epioksitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneyisel t_R	γ aktivlik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneyisel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
3	4,370	0,851	0,644	0,640	0,000010
3,5	4,400	0,834	0,640	0,643	0,000012
4	4,300	0,828	0,632	0,633	0,000003
4,5	4,131	0,825	0,620	0,616	0,000014
5	4,092	0,824	0,610	0,612	0,000003
				Toplam	0,000330

Çizelge incelendiğinde 4-epioksitetrasiklinin %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneyisel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbirine uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneyisel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.50' de verilmiştir.



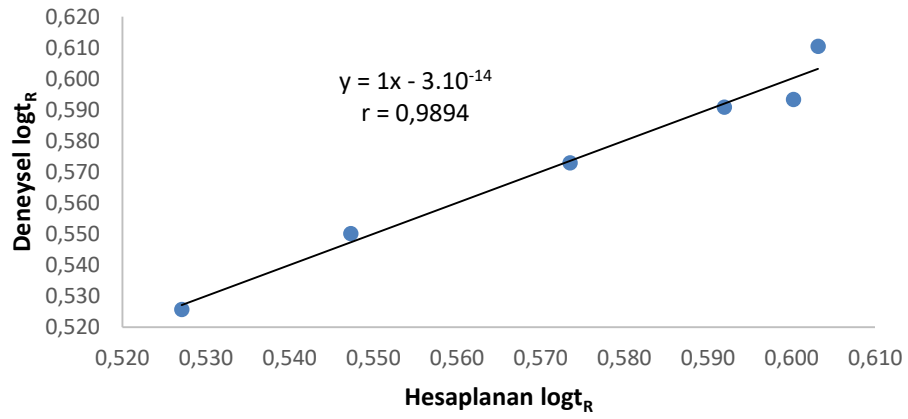
Şekil 4.50. 4-epioksitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. 4-epioksitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.35' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.35. 4-epioksitetrasiklin için %25 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

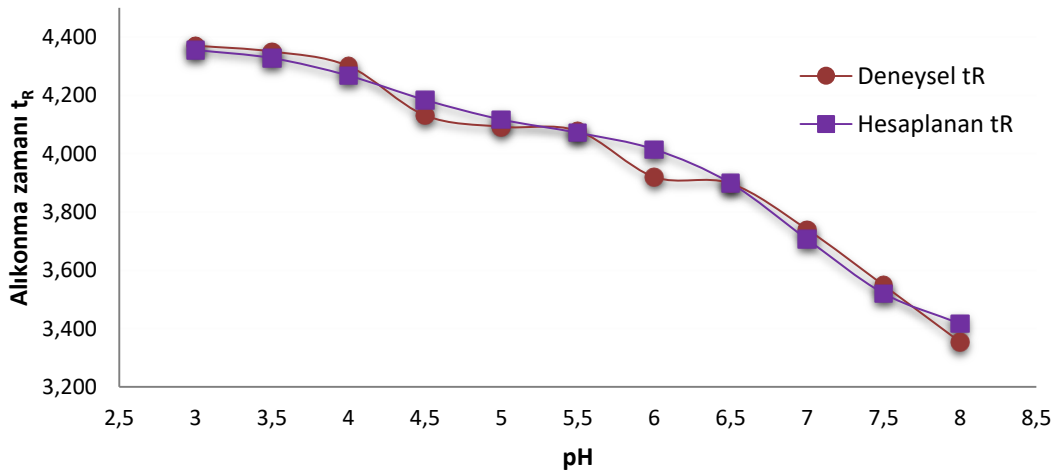
pH	Deneyysel t_R	γ aktiflik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneyysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	4,078	0,824	0,603	0,610	0,000053
6	3,920	0,822	0,600	0,593	0,000048
6,5	3,898	0,818	0,592	0,591	0,000001
7	3,740	0,808	0,574	0,573	0,000000
7,5	3,549	0,790	0,547	0,550	0,000008
8	3,355	0,770	0,527	0,526	0,000002
				Toplam	0,000112

Çizelge incelendiğinde 4-epioksitetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.51' de verilmiştir.



Şekil 4.51. 4-epioksitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında, pH 5,5-8 arasındaki deneysel ve hesaplanan **$\log t_R$** değerlerinin uyumunu gösteren grafik

% 25 asetonitril:su ikili karışımında, mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.52' de verilmiştir.



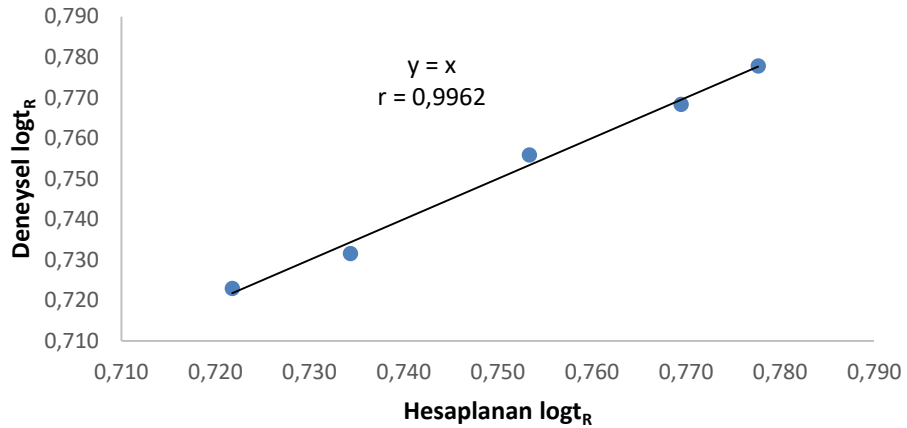
Şekil 4.52. 4-epioksitetrasiklin için % 25 asetonitril:su ikili karışımında pH-alıkonma zamanı ilişkisi

4-epioksitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3,0-5 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.36' da verilmiştir.

Çizelge 4.36. 4-epioksitebrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 3-5 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Deneyssel t_R	γ aktiflik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneyssel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
3	5,996	0,850	0,778	0,778	0,00000003
3,5	5,866	0,837	0,769	0,768	0,0000013
4	5,700	0,832	0,753	0,756	0,000063
4,5	5,390	0,831	0,734	0,732	0,000075
5	5,284	0,830	0,722	0,723	0,0000014
				Toplam	0,000017

Çizelge incelendiğinde 4-epioksitebrasiklinin %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pK_{a1} değerinin hesaplanmasına yönelik yapılan çalışmada deneyssel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneyssel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.53' de verilmiştir.



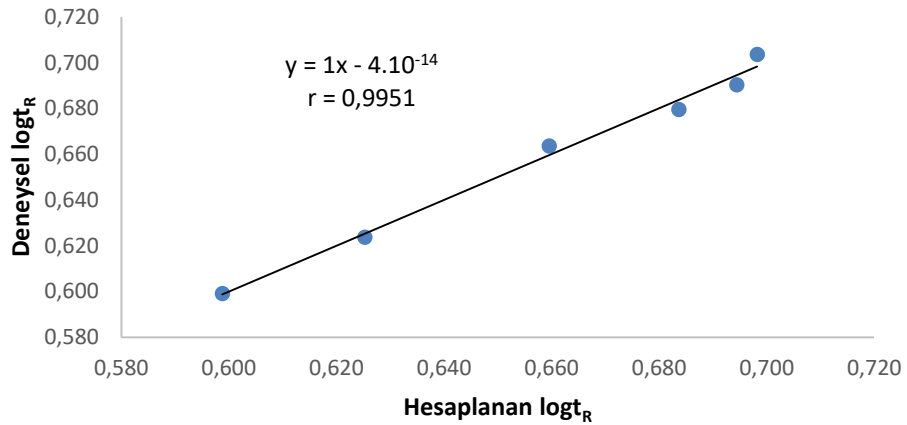
Şekil 4.53. 4-epioksitebrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, pH 3-5 arasındaki deneyssel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

Grafikte elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı değerleri beklenildiği gibidir. 4-epioksitebrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8 aralığında elde edilen alıkonma değerleri (t_R) Çizelge 4.37' de verilmiştir. Bu çizelgede bu ortam için hesaplanmış aktiflik katsayıları da (γ) verilmiştir.

Çizelge 4.37. 4-epioksitetrasiklin için %20 (v/v) asetonitril:su ikili karışımında pH 5,5-8,0 aralığında tayin edilen ve hesaplanan alıkonma değerleri

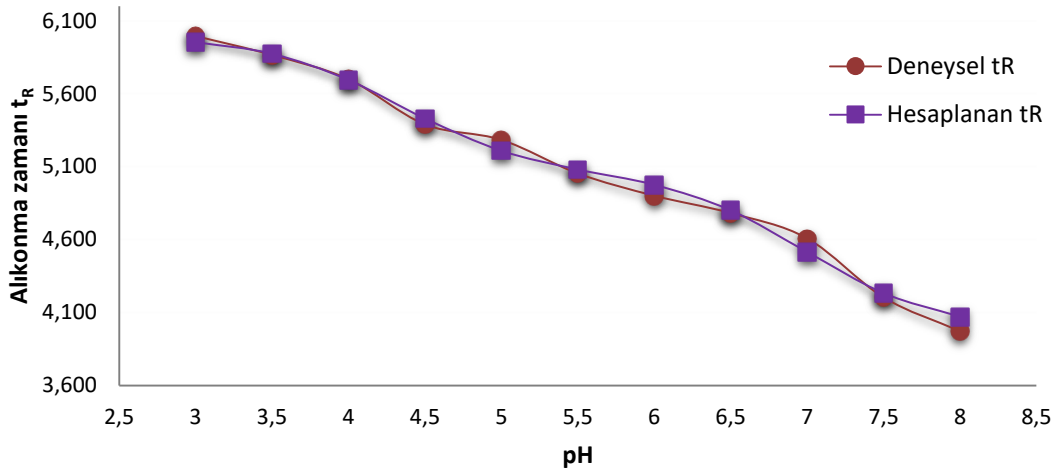
pH	Deneysel t_R	γ aktivlik	Hesaplanan $\log t_R$	Deneysel $\log t_R$	$\Delta(\text{Den.-Hes.})^2$
5,5	5,054	0,829	0,698	0,704	0,000029
6	4,901	0,827	0,694	0,690	0,000017
6,5	4,782	0,822	0,684	0,680	0,000016
7	4,609	0,810	0,660	0,664	0,000016
7,5	4,204	0,791	0,625	0,624	0,000002
8	3,972	0,773	0,599	0,599	0,000000
				Toplam	0,000081

Çizelge incelendiğinde 4-epioksitetrasiklinin pK_{a2} değerine yönelik yapılan çalışmada deneysel ve hesaplanan logaritmik değerlerinin birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Hesaplanan $\log t_R$ ile deneysel olarak bulunan $\log t_R$ grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim, kesim ve korelasyon katsayısı (r) değerleri Şekil 4.54' de verilmiştir.



Şekil 4.54. 4-epioksitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında, 5,5-8,0 arasındaki deneysel ve hesaplanan $\log t_R$ değerlerinin uyumunu gösteren grafik

% 20 asetonitril:su ikili karışımında, mobil faz pH değerleri, deneysel alıkonma değerleri ve tahmini pK_a değeri kullanılarak diprotik asit için geliştirilmiş Horvarth-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerleri de hesaplanmıştır. Mobil faz pH değerlerine karşı alıkonma değerleri grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal Şekil 4.55' de verilmiştir.

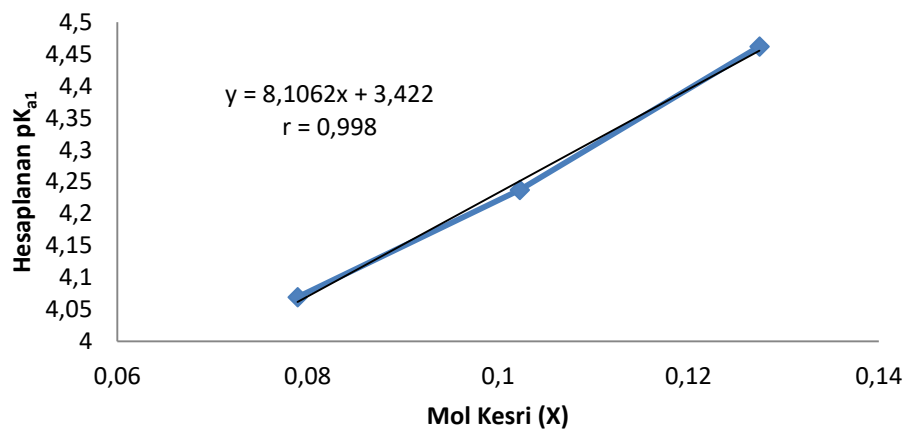


Şekil 4.55. 4-epioksitetrasiklin için % 20 asetonitril:su ikili karışımında pH-alıkonma zamanı ilişkisi

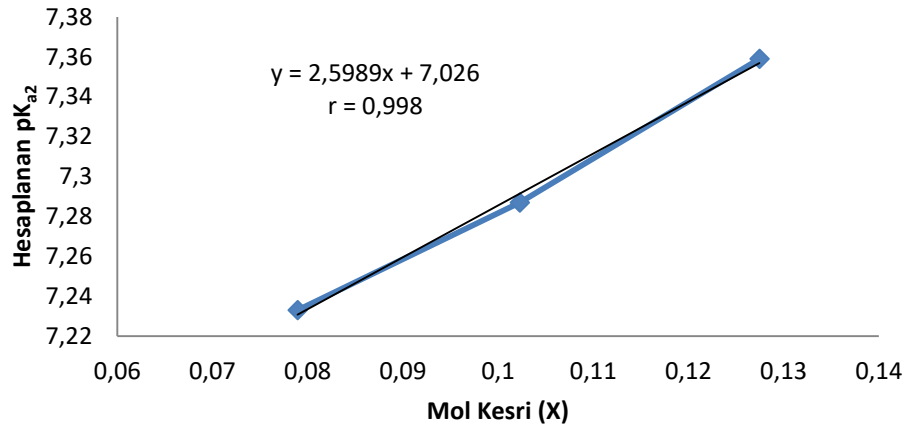
4.3. Su Ortamındaki pKa Değerlerinin Tayini

4.3.1. Mol kesri-pKa yöntemi

Bu yöntem kullanılarak tetrasiklin için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) aetonitril-su ikili karışımlarında, mol kesri (X) değerlerine karşı bu ortamlar için hesaplanmış pKa₁ ve pKa₂ değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıların kesim noktalarından sudaki pKa değerleri belirlenmiştir. Tetrasiklin için elde edilen grafikler, Şekil 4.56 ve Şekil 4.57' de verilmiştir.

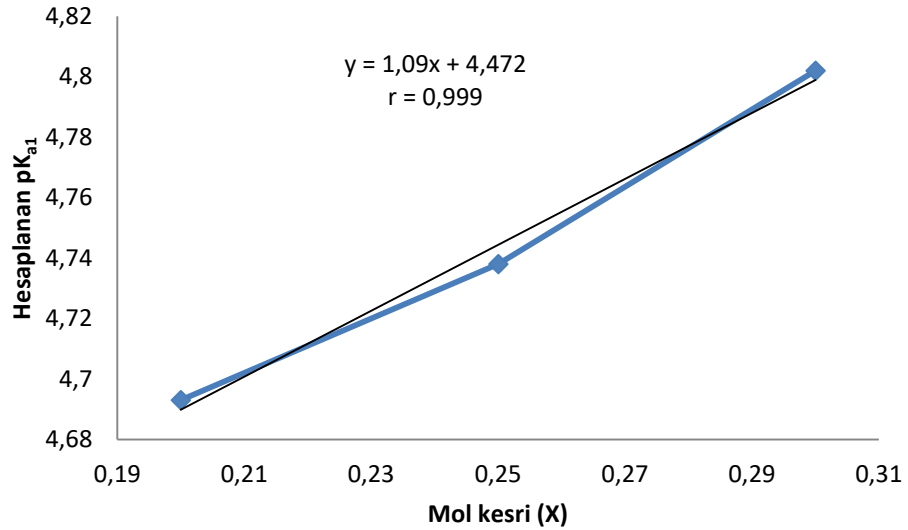


Şekil 4.56. Tetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa₁ değerinin hesaplanması

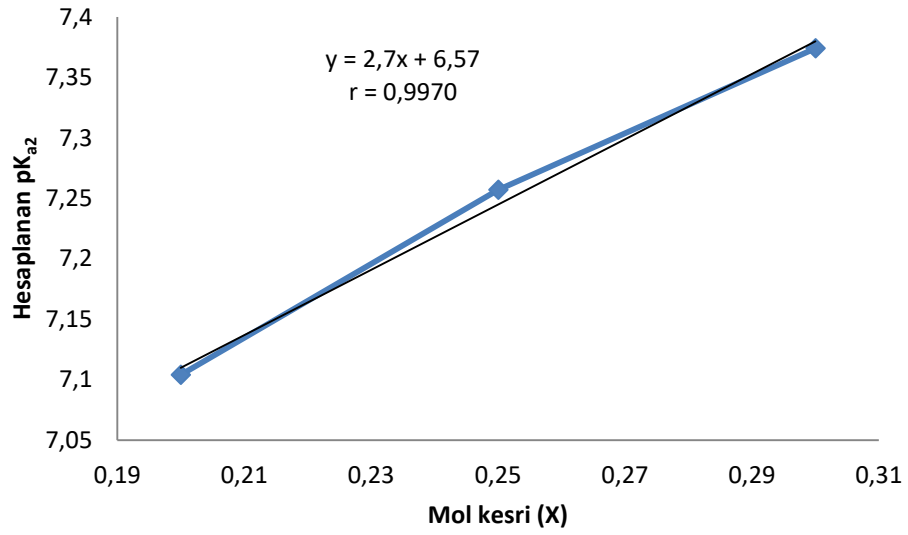


Şekil 4.57. Tetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa2 değerinin hesaplanması

Bu yöntem kullanılarak 4-epitetrasiklin için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) aetonitril-su ikili karışımlarında, mol kesri (X) değerlerine karşı bu ortamlar için hesaplanmış pKa1 ve pKa2 değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıların kesim noktalarından sudaki pKa değerleri belirlenmiştir. 4-epitetrasiklin için elde edilen grafikler, Şekil 4.58 ve Şekil 4.59' da verilmiştir.

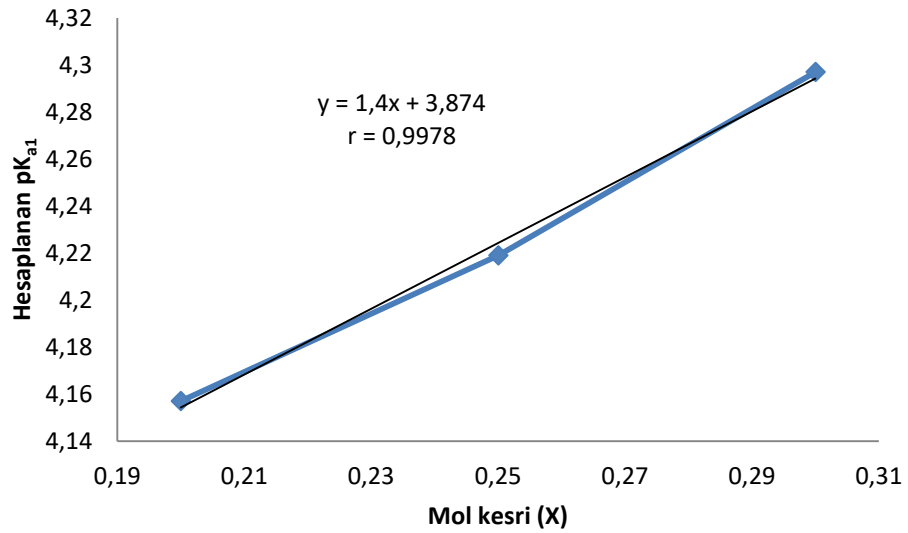


Şekil 4.58. 4-epitetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa1 değerinin hesaplanması

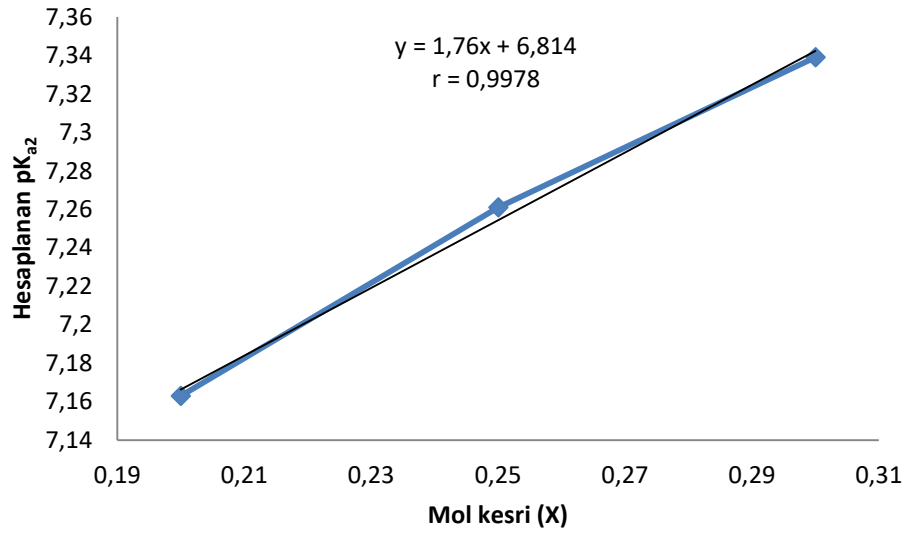


Şekil 4.59. 4-epitetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa2 değerinin hesaplanması

Bu yöntem kullanılarak klortetrasiklin için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) asetonitril-su ikili karışımlarında, mol kesri (X) değerlerine karşı bu ortamlar için hesaplanmış pKa1 ve pKa2 değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıların kesim noktalarından sudaki pKa değerleri belirlenmiştir. Klortetrasiklin için elde edilen grafikler, Şekil 4.60 ve Şekil 4.61' de verilmiştir.

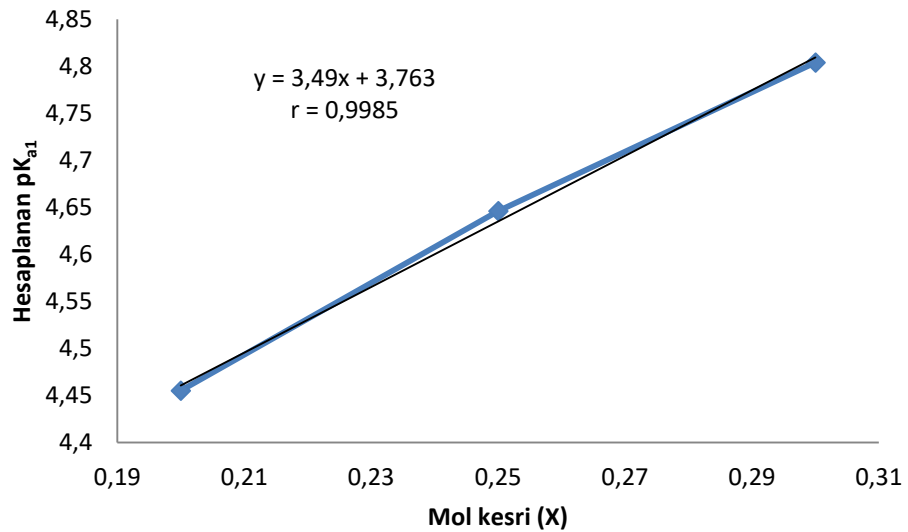


Şekil 4.60. Klortetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa1 değerinin hesaplanması

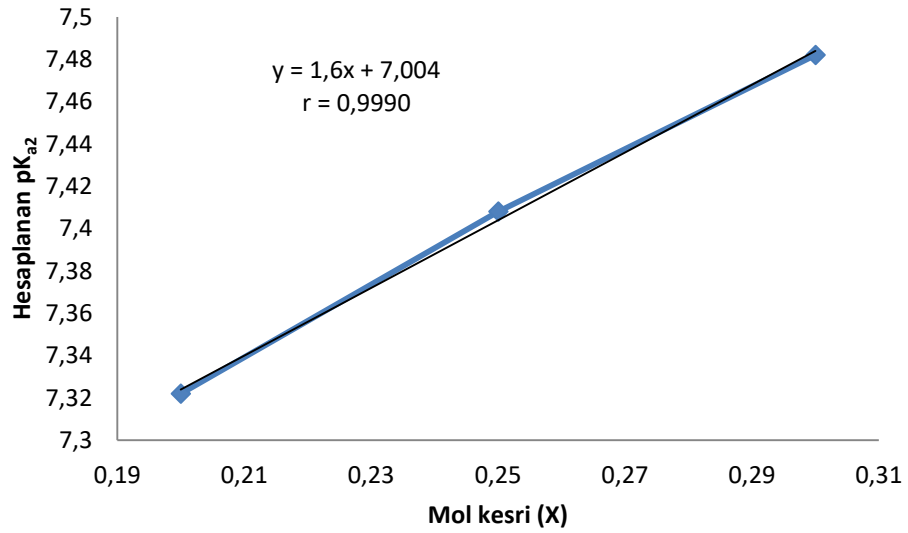


Şekil 4.61. Klorotetracycline mol kesri-pK_a yöntemiyle sudaki pK_{a2} değerinin hesaplanması

Bu yöntem kullanılarak 4-epiklorotetracycline için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) aetonitril-su ikili karışımlarında, mol kesri (X) değerlerine karşı bu ortamlar için hesaplanmış pK_{a1} ve pK_{a2} değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıların kesim noktalarından sudaki pK_a değerleri belirlenmiştir. 4-epiklorotetracycline için elde edilen grafikler, Şekil 4.62 ve Şekil 4.63' de verilmiştir.

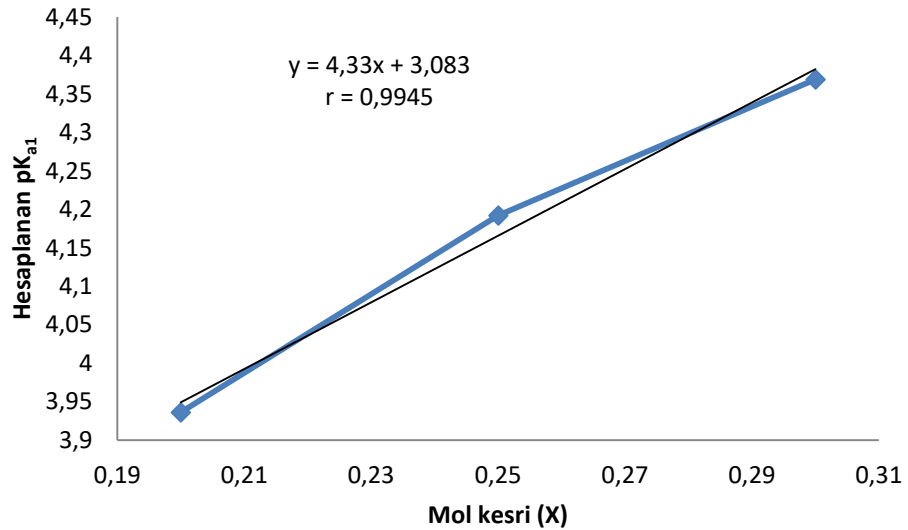


Şekil 4.62. 4-epiklorotetracycline mol kesri-pK_a yöntemiyle sudaki pK_{a1} değerinin hesaplanması

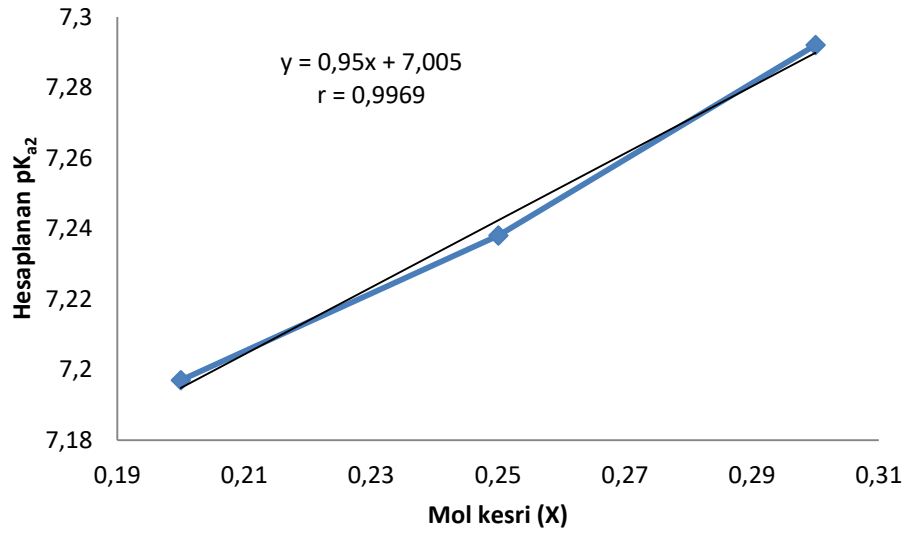


Şekil 4.63. 4-epiklortetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa2 değerinin hesaplanması

Bu yöntem kullanılarak oksitetrasiklin için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) aetonitril-su ikili karışımlarında, mol kesri (X) değerlerine karşı bu ortamlar için hesaplanmış pKa1 ve pKa2 değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıların kesim noktalarından sudaki pKa değerleri belirlenmiştir. Oksitetrasiklin için elde edilen grafikler, Şekil 4.64 ve Şekil 4.65' de verilmiştir.

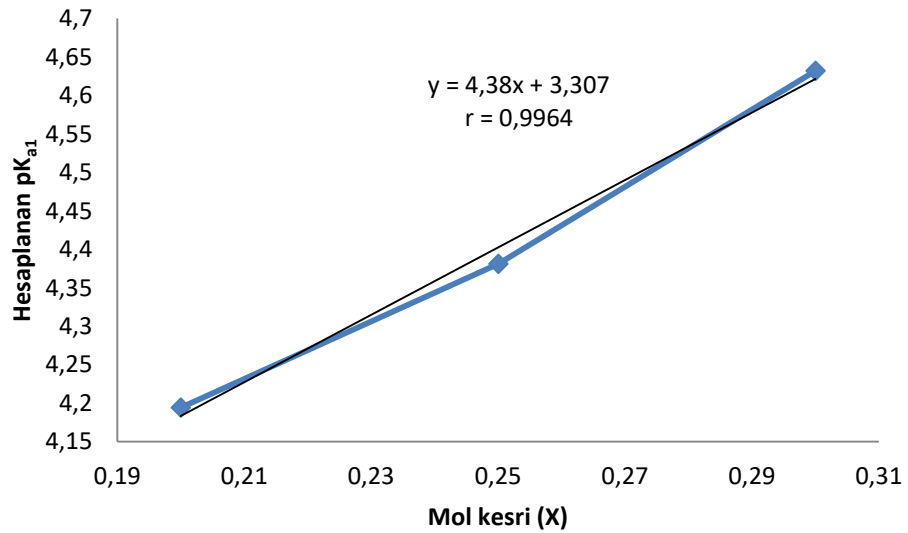


Şekil 4.64. Oksitetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa1 değerinin hesaplanması

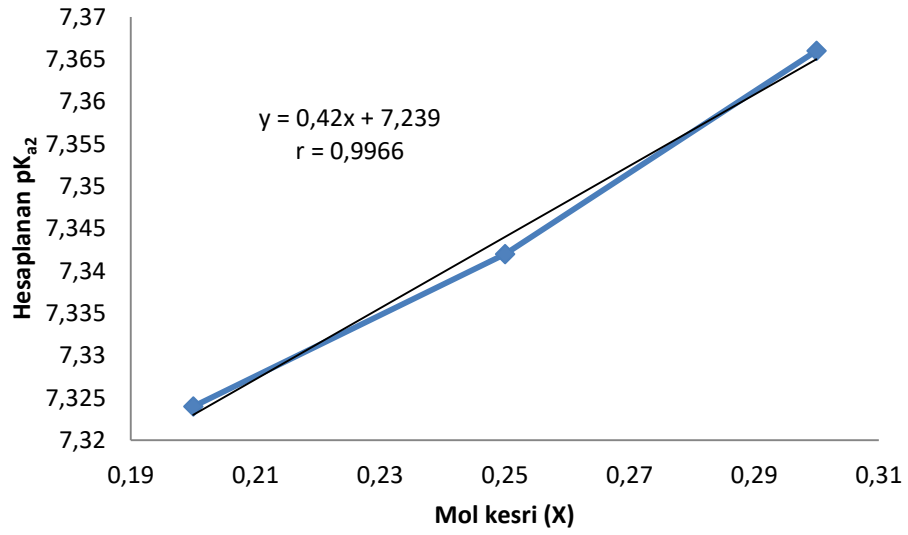


Şekil 4.65. Oksitetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa2 değerinin hesaplanması

Bu yöntem kullanılarak 4-epioksitetrasiklin için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) asetonitril-su ikili karışımlarında, mol kesri (X) değerlerine karşı bu ortamlar için hesaplanmış pKa1 ve pKa2 değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıların kesim noktalarından sudaki pKa değerleri belirlenmiştir. 4-epioksitetrasiklin için elde edilen grafikler, Şekil 4.66 ve Şekil 4.67' de verilmiştir.



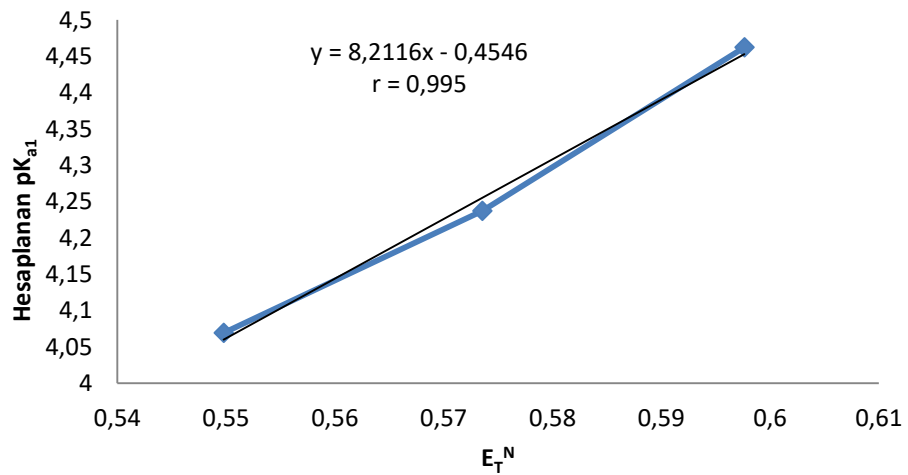
Şekil 4.66. 4-epioksitetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa1 değerinin hesaplanması



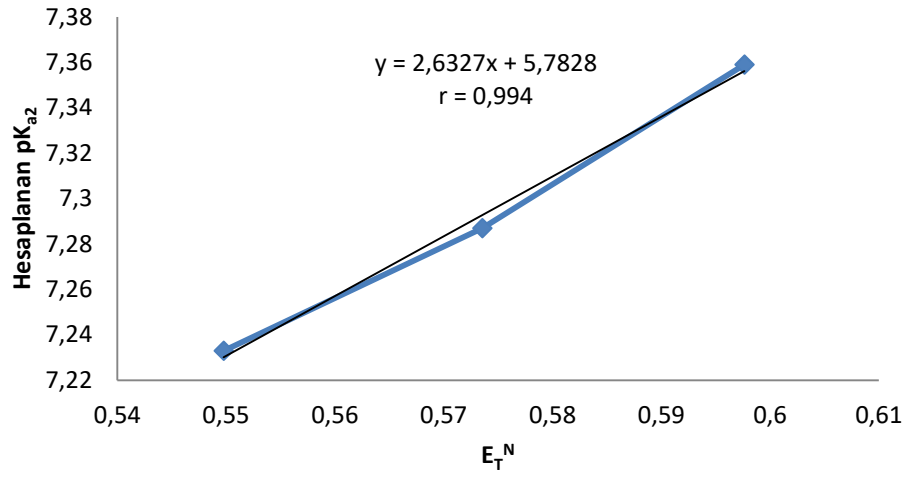
Şekil 4.67. 4-epioksitetrasiklinin mol kesri-pKa yöntemiyle sudaki pKa2 değerinin hesaplanması

4.3.2. Mobil Faz Solvatokromik Parametresi (E_T^N) Kullanılarak Yapılan Hesaplama

Bu yöntem kullanılarak tetrasiklin için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) asetonitril-su ikili karışımlarındaki solvatokromik çözücü parametresine karşı bu ortamlar için hesaplanmıştır. pKa1 ve pKa2 değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntılarda solvatokromik çözücü parametresi (x) yerine sudaki sabit değer olan 0,46 konularak su ortamındaki değerler belirlenmiştir. Tetrasiklin için elde edilen grafikler, Şekil 4.68 ve Şekil 4.69' da verilmiştir.

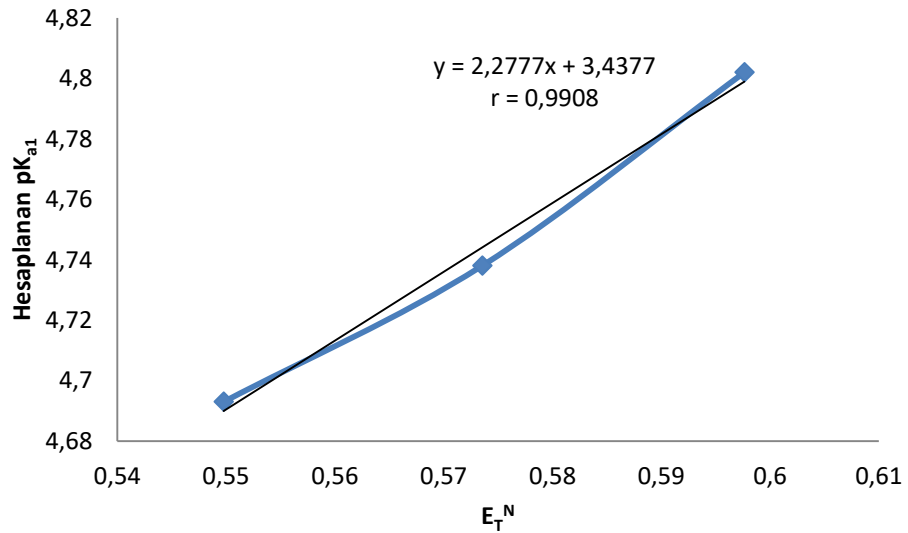


Şekil 4.68. Tetrasiklinin E_T^N -pKa1 ilişkisi kullanılarak sudaki pKa1 değerinin hesaplanması

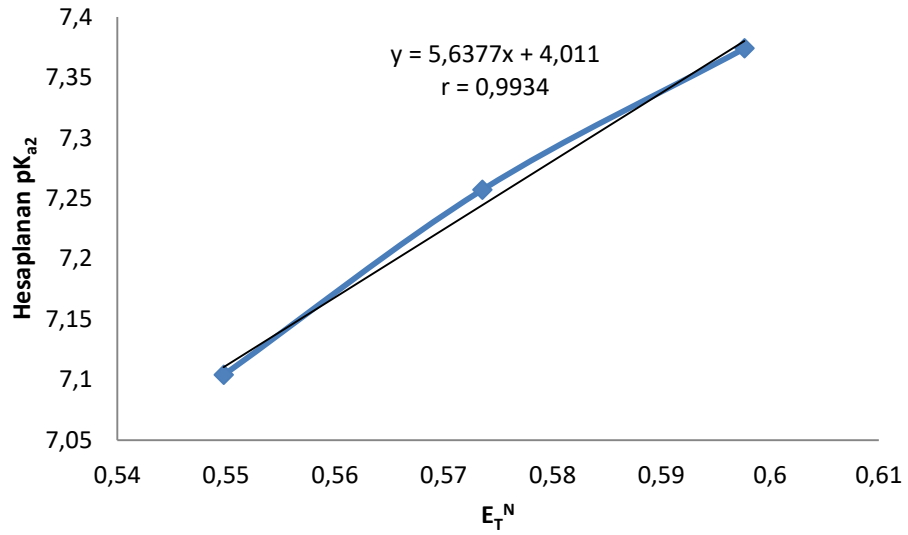


Şekil 4.69. Tetrasiklinin E_T^N - pK_{a2} ilişkisi kullanılarak sudaki pK_{a2} değerinin hesaplanması

Bu yöntem kullanılarak 4-epitetrasiklin için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) asetonitril-su ikili karışımlarındaki solvatokromik çözücü parametresine karşı bu ortamlar için hesaplanmıştır. pK_{a1} ve pK_{a2} değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntılarda solvatokromik çözücü parametresi (x) yerine sudaki sabit değer olan 0,46 konularak su ortamındaki değerler belirlenmiştir. 4-epitetrasiklin için elde edilen grafikler, Şekil 4.70 ve Şekil 4.71' de verilmiştir.

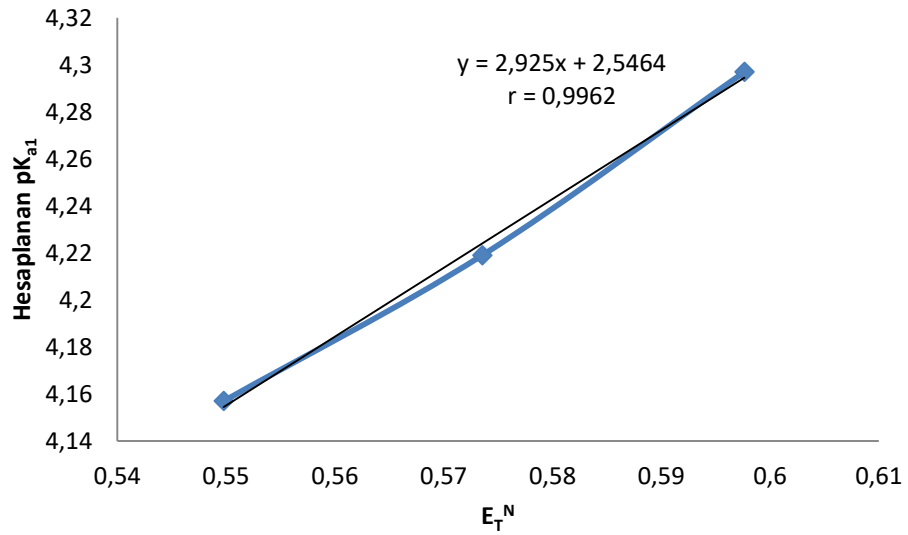


Şekil 4.70. 4-epitetrasiklinin E_T^N - pK_{a1} ilişkisi kullanılarak sudaki pK_{a1} değerinin hesaplanması

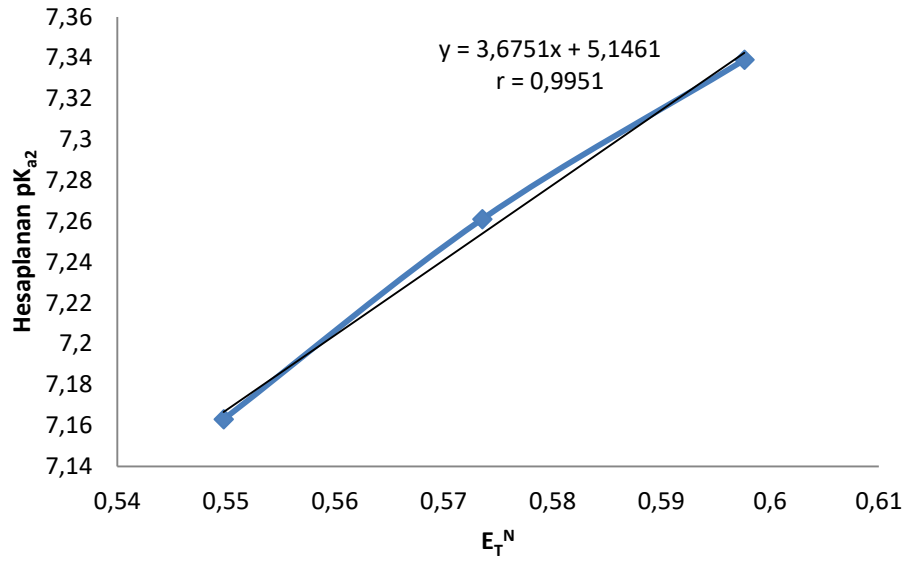


Şekil 4.71. 4-epitetrasiklinin E_T^N - pK_{a2} ilişkisi kullanılarak sudaki pK_{a2} değerinin hesaplanması

Bu yöntem kullanılarak klortetrasiklin için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) asetonitril-su ikili karışımlarındaki solvatokromik çözücü parametresine karşı bu ortamlar için hesaplanmıştır. pK_{a1} ve pK_{a2} değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntılarda solvatokromik çözücü parametresi (x) yerine sudaki sabit değer olan 0,46 konularak su ortamındaki değerler belirlenmiştir. Klortetrasiklin için elde edilen grafikler, Şekil 4.72 ve Şekil 4.73' de verilmiştir.

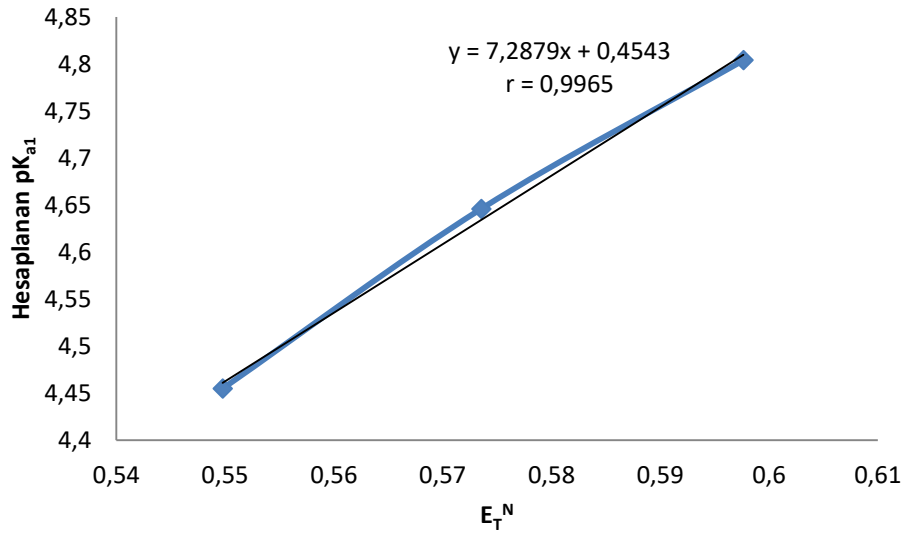


Şekil 4.72. Klortetrasiklinin E_T^N - pK_{a1} ilişkisi kullanılarak sudaki pK_{a1} değerinin hesaplanması

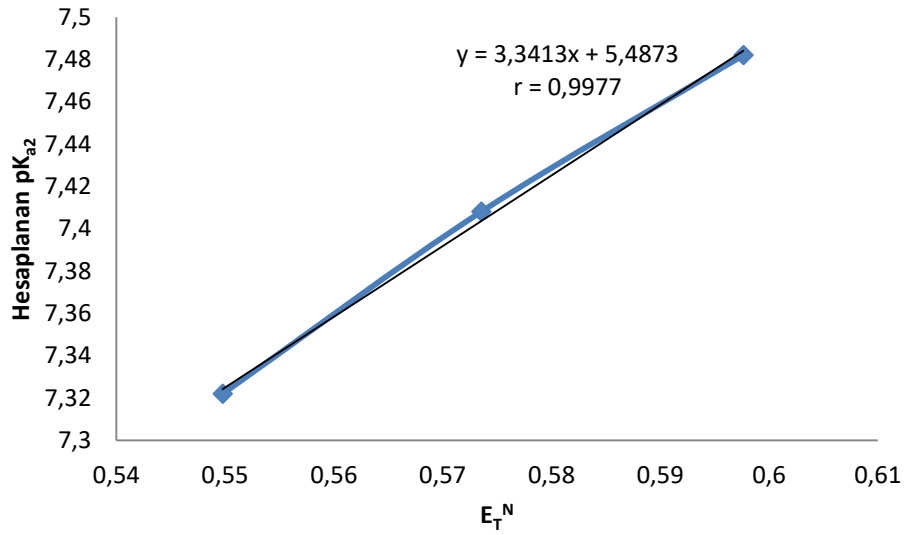


Şekil 4.73. Klortetrasiklinin E_T^N - pK_{a2} ilişkisi kullanılarak sudaki pK_{a2} değerinin hesaplanması

Bu yöntem kullanılarak 4-epiklortetrasiklin için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) asetonitril-su ikili karışımlarındaki solvatokromik çözücü parametresine karşı bu ortamlar için hesaplanmıştır. pK_{a1} ve pK_{a2} değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntılarda solvatokromik çözücü parametresi (x) yerine sudaki sabit değer olan 0,46 konularak su ortamındaki değerler belirlenmiştir. 4-epiklortetrasiklin için elde edilen grafikler, Şekil 4.74 ve Şekil 4.75' de verilmiştir.

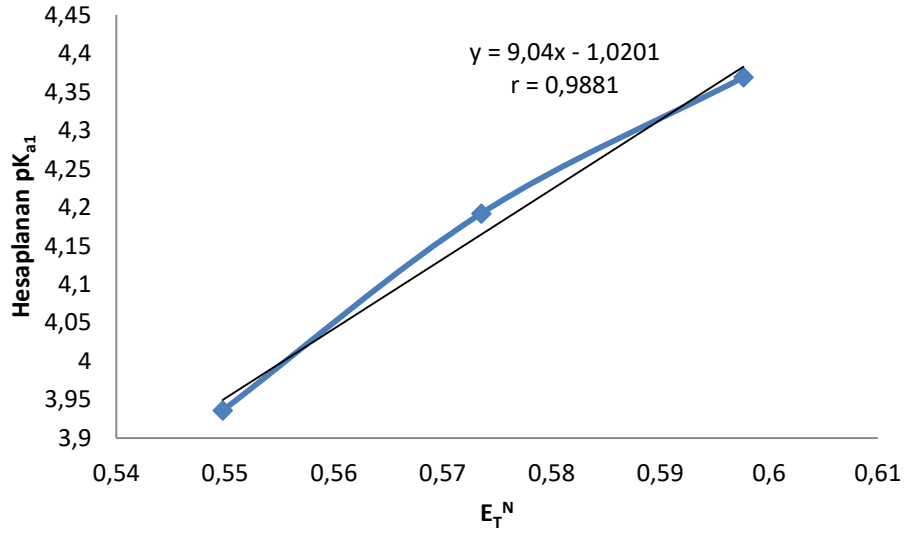


Şekil 4.74. 4-epiklortetrasiklinin E_T^N - pK_{a1} ilişkisi kullanılarak sudaki pK_{a1} değerinin hesaplanması

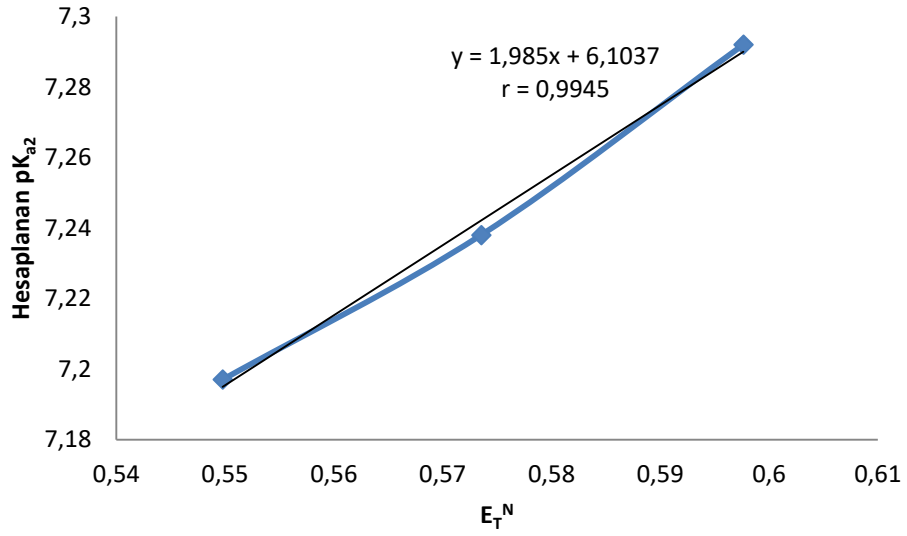


Şekil 4.75. 4-epiklortetrasiklinin E_T^N - pK_{a2} ilişkisi kullanılarak sudaki pK_{a2} değerinin hesaplanması

Bu yöntem kullanılarak oksitetrasiklin için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) asetonitril-su ikili karışımlarındaki solvatokromik çözücü parametresine karşı bu ortamlar için hesaplanmıştır. pK_{a1} ve pK_{a2} değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntılarda solvatokromik çözücü parametresi (x) yerine sudaki sabit değer olan 0,46 konularak su ortamındaki değerler belirlenmiştir. Oksitetrasiklin için elde edilen grafikler, Şekil 4.76 ve Şekil 4.77' de verilmiştir.



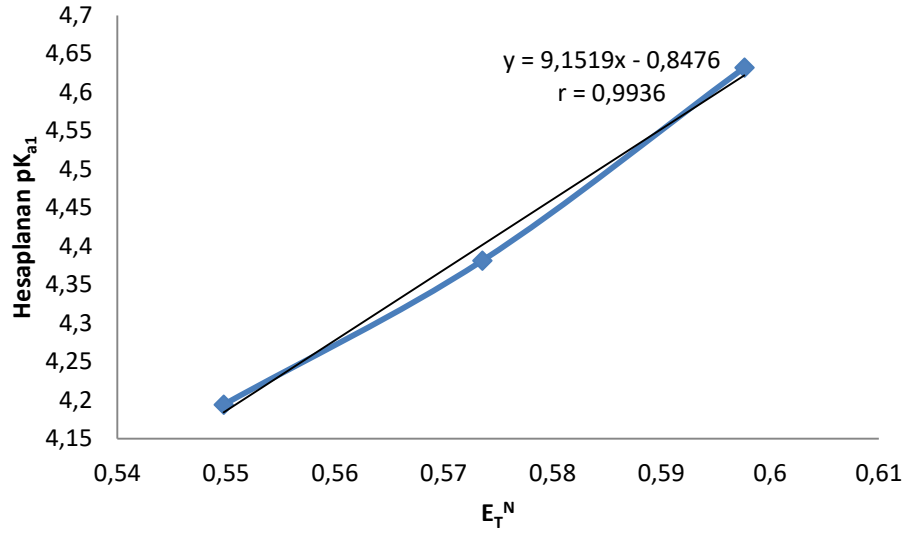
Şekil 4.76. Oksitetrasiklinin E_T^N - pK_{a1} ilişkisi kullanılarak sudaki pK_{a1} değerinin hesaplanması



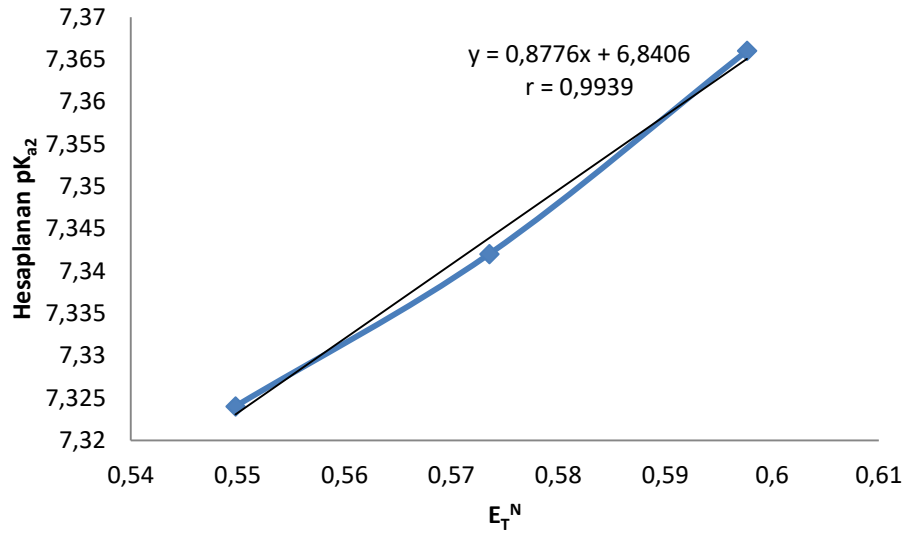
Şekil 4.77. Oksitetrasiklinin E_T^N - pK_{a2} ilişkisi kullanılarak sudaki pK_{a2} değerinin hesaplanması

Bu yöntem kullanılarak 4-epioksitetrasiklin için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) asetonitril-su ikili karışımlarındaki solvatokromik çözücü parametresine karşı bu ortamlar için hesaplanmıştır. pK_{a1} ve pK_{a2} değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntılarda solvatokromik çözücü parametresi (x) yerine sudaki sabit değer olan 0,46 konularak su ortamındaki değerler belirlenmiştir. 4-

Epioksitetrasiklin için elde edilen grafikler, Şekil 4.78 ve Şekil 4.79' de verilmiştir.



Şekil 4.78. 4-epioksitetrasiklinin E_T^N - pK_{a1} ilişkisi kullanılarak sudaki pK_{a1} değerinin hesaplanması

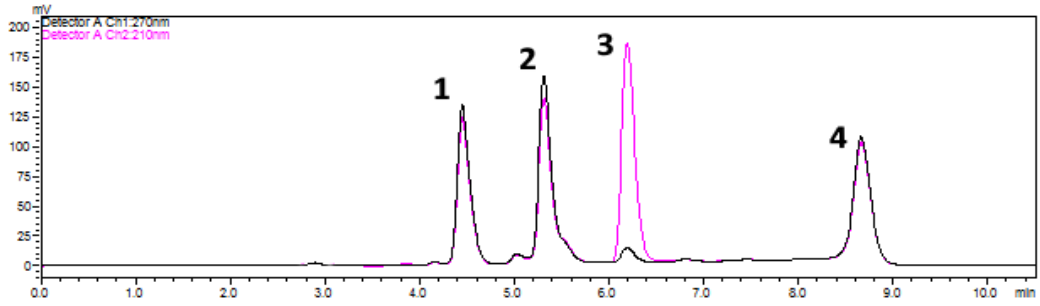


Şekil 4.79. 4-epioksitetrasiklinin E_T^N - pK_{a2} ilişkisi kullanılarak sudaki pK_{a2} değerinin hesaplanması

4.4. Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu

Bu çalışmada geniş spektrumlu bir antibiyotik grubu olan tetrasiklin bileşikleri tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklinin kalitatif ve kantitatif tayini ters faz sıvı sıvı kromatografi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin pik simetrisi ve alıkonma davranışları incelendiğinde polar özellikte olan bu bileşikler için Kinetex F5 (2,6 μ m, 150x4.6 mm) kolon tercih edilmiştir. Bu tez çalışmasında bileşiklerin alıkonma zamanları ve pik simetrisi göz önüne alınarak mobil faz organik modifiyeri olarak asetonyitril tercih edilmiştir.

Kromatografik ayırmada kapasite faktörü değeri 1 ve 1' den büyük olması, piklerin birbirinden ayrılabilmesi için seçicilik faktörü (α) değeri 1,15 olması, ayırma gücü (R_s) değeri 2 ve daha büyük olması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, mobil fazda organik modifiyer olarak tercih edilen asetonyitrilin farklı derişimlerinde ve mobil fazın farklı pH değerlerinde elde edilen kromatografik veriler kullanılarak bileşiklerin ayırma optimum koşulları belirlenmiştir. Numune çalışması için tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklinin iyonlaşma sabitlerinin tayini çalışmalarından elde edilen bütün koşullar incelendiğinde asetonyitril: su ikili karışımında (25:75, % h/h) pH 3,0' de kapasite faktörlerinin 1' den daha büyük olduğu ve bileşik çiftleri için α değerlerinin 1,15' den büyük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca her bir bileşik çifti için R_s değerleri de 2' den büyüktür. Ayırma koşulu belirlendikten sonra bileşiklerin Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi atık su arıtma tesisinden elde edilen numunede tespiti için iç standart yöntemi kullanılmıştır. Bunun için bu üç bileşikten ayrılabilen, pik simetrisi oldukça iyi olan flukonazol iç standart olarak seçilmiştir. Ayırmanın kromatogramı, Şekil 4.80' de verilmiştir.



Şekil 4.80. Standart karışım kromatogramı A) 1. Pravastatin (33 µg/mL); 2. Losartan (I.S.) (33 µg/mL); 3. Atorvastatin (33 µg/mL), B) 1. Rosuvastatin (50 µg/mL); 2. Losartan (I.S.) (50 µg/mL)

4.5. Numune Çalışması

Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmalarında; yöntemin duyarlılık, kesinlik, doğruluk parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır (ICH, 1996).

4.5.1. İç Standartın Belirlenmesi

İç standart, analizde belirli miktarda numuneye, kalibrasyon standartlarına eklenen maddedir. Ayrıca kalibrasyon fonksiyonunun hazırlanmasında ve numune hazırlık işlemlerinde derişimi sabit tutulmaktadır. İç standart uygun seçilirse, hem sistematik hem de rastgele hatalar giderilebilir. Tetrasiklin, oksitetrasiklin ve klortetrasiklinin sıvı kromatografik analizi sırasında kullanılacak iç standart seçimi için farklı ilaç aktif maddeleri denenmiştir. Seçicilik, ayırma gücü ve analiz süresi göz önüne alınarak bileşiklerin analizinde iç standart olarak flukonazol seçilmiştir.

4.5.2. Tetrasiklin, Oksitetrasiklin ve Klortetrasiklinin Ters Faz Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Analizinde Metot Validasyonu

Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla validasyon parametrelerine göre test edilmesinde kaynaklarda bildirilen parametreler seçilmiş ve ilgili geçerlilik kriterleri kabul edilmiştir. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında; doğrusalılık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

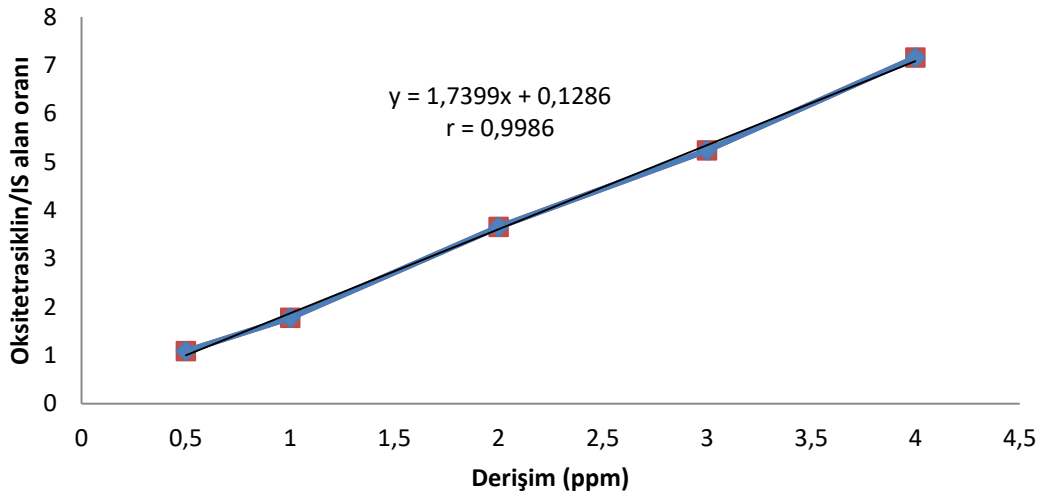
4.5.2.1. Kalibrasyon Doğrusu ve Duyarlılık

Tetrasiklin, klortetrasiklin ve oksitetrasiklinin yüksek performans sıvı kromatografisi ile analizi yönteminde doğrusal aralığın saptanmasında tetrasiklin ve klortetrasiklin için 1 µg/mL ile 5 µg/mL (Şekil 4.81, Şekil 4.82) arasında, oksitetrasiklin için 0,5 ve 4 µg/mL (Şekil 4.83) arasında değişen standart çözeltilerinden farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır.

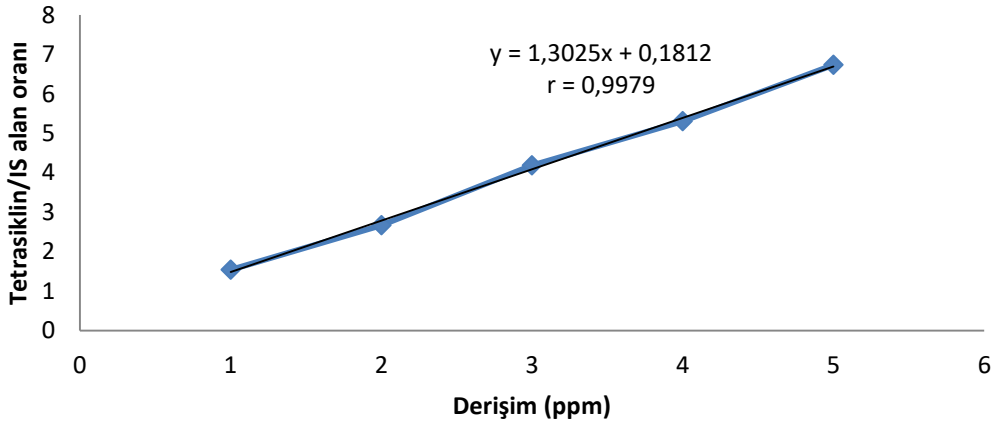
Kalibrasyon doğrusu, bileşiklerin her bir derişim değeri için elde edilen pik alanının flukanazol (iç standart) pik alanına oranı değerine karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur. Geliştirilen yöntem yukarıda hazırlanan derişim aralıklarında doğrusaldır. Bileşiklerin analizi için doğrusal aralık verileri, Çizelge 4.38' de verilmiştir.

Çizelge 4.38. Bileşiklerin analizine ait kalibrasyon fonksiyonu özellikleri

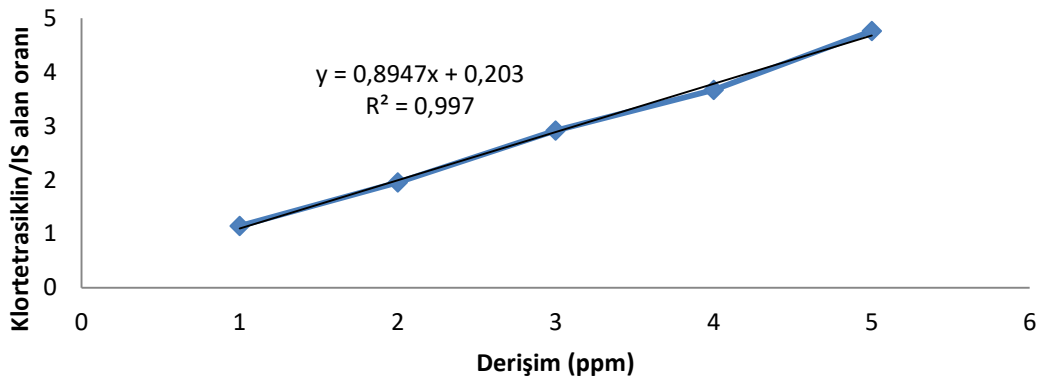
Veriler	Tetrasiklin	Oksitetrasiklin	Klortetrasiklin
Regresyon Denklemi*	$y = 1,303x + 0,181$	$y = 1,740x + 0,129$	$y = 0,895x + 0,203$
Eğimin Standart Hatası	0,035	0,093	0,028
Kesimin Standart Hatası	0,114	0,109	0,093
Korelasyon Katsayısı (r)	0,998	0,999	0,997
Kalibrasyon Aralığı (µg/mL)	1-5	0,5-4	1-5
Teşhis Sınırı (µg/mL)	0,276	0,206	0,329
Tayin Alt Sınırı (µg/mL)	0,838	0,625	0,996



Şekil 4.81. Oksitetrasiklinin analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu



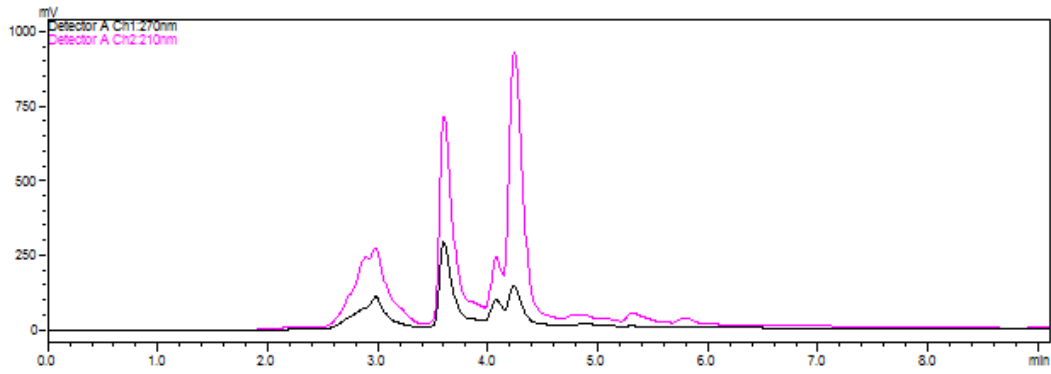
Şekil 4.82. Tetrasiklinin analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu



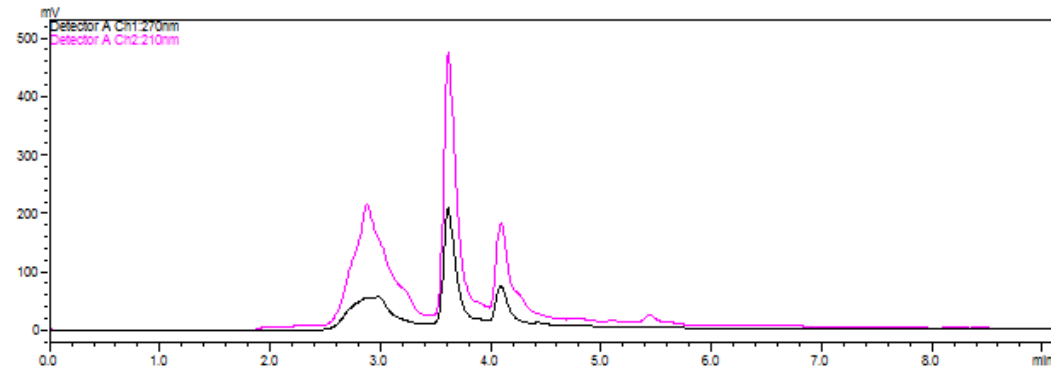
Şekil 4.83. Klortetrasiklinin analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu

4.5.3. Atık Su Numunesinde Geri Kazanım Çalışması

Literatür araştırmasında yüksek geri kazanımların pH 4,5' da elde edildiği görülmüştür. Bu sebeple çalışmada atık su numunesinin derişik formik asitle pH' sı 4,5' a ayarlanmıştır. Çalışmada iki farklı markada C18 katı faz kartuş tercih edilmiştir. Öncelikle kartuş şartlama işleminde 5 mL metanol ve 5 mL saf su kullanılmıştır. Daha yapılacak zenginleştirme işlemi için SUPELCO kartuşa 100 mL, OASİS HLB kartuşa 70 mL atık su uygulanmıştır. Sonraki işlemde kartuştan elue etme SUPELCO kartuşa 10 mL metanol, OASİS HLB kartuşa 7 mL metanol ile gerçekleştirilmiştir. Elue edilen çözeltiler evaporatörle buharlaştırılmıştır. Kalıntılar 1 mL mobil fazda çözülmüş ve HPLC sistemine enjekte etmeden önce 0,45 µM Millipore filtreden geçirilmiştir. Yapılan analiz sonucunda elde edilen kromatogramlar Şekil 4.84 ve Şekil 4.85' de verilmiştir.



Şekil 4.84. Oasis HLB katı faz kartuşuna uygulanan numunenin kromatogramı

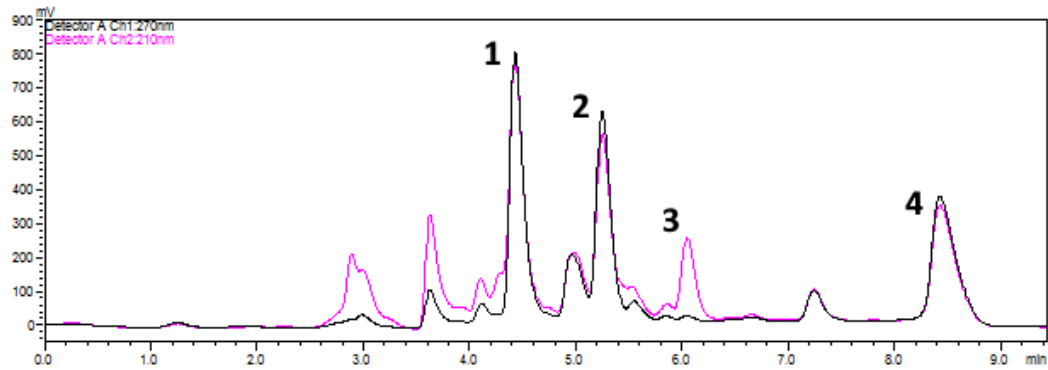


Şekil 4.85. Süpelco katı faz kartuşuna uygulanan numunenin kromatogramı

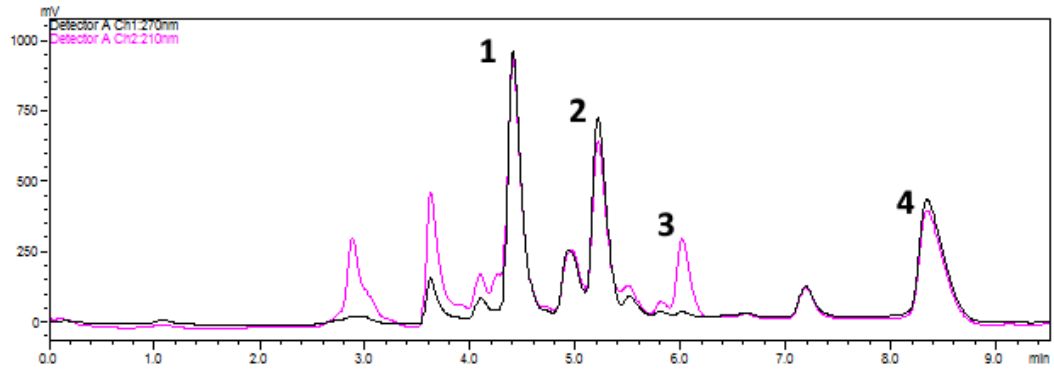
Atık su uygulaması sonucunda iki kartuşa uygulanan numunede dedeksiyon limitinin altında tetrasiklin, klortetrasiklin ve oksitetrasiklin olduğu için numuneye bu bileşiklerin saf standartlarından katkı yapılarak tekrar numune hazırlanmıştır. Sonuçta farklı derişimlerde katkılandırılmış bileşikler ve iç standartla çalışmanın geri kazanım yüzdeleri hesaplanmıştır (Çizelge 4.39). Katkılandırılmış numunelerin kromatogramları Şekil 4.86 ve Şekil 4.87' de verilmiştir.

Çizelge 4.39. Katkılandırılmış bileşikleri içeren atık su numunesinin % geri kazanım sonuçları

Bileşikler	SUPELCO C18	OASİS HLB
Oksitetrasiklin	%69,23	%69,27
Klortetrasiklin	%81,43	%85,63
Tetrasiklin	%46,45	%49,40



Şekil 4.86. Oasis HLB katı faz kartuşuna uygulanan numunenin kromatogramı 1- Oksitetrasiklin (3 ppm); 2- Tetrasiklin (4 ppm); 3- Flukonazol (IS) (0,5 ppm); 4- Klortetrasiklin (4 ppm)



Şekil 4.87. Süpelco katı faz kartuşuna uygulanan numunenin kromatogramı 1- Oksitetrasiklin (3 ppm); 2- Tetrasiklin (4 ppm); 3- Flukonazol (IS) (0,5 ppm); 4- Klortetrasiklin (4 ppm)

5.TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Tetrasiklin grubu antibiyotiklerin kullanım sıklığı oldukça yüksek olduğundan, yapılarının aydınlatılması ve farmakolojik özelliklerinin tam anlamıyla açıklanması klinik çalışmalarda ve geliştirilme sürecinde çalışmacılara büyük katkı sağlamaktadır. Bu ilaçların sudaki iyonlaşma sabitleri, rutin ilaç analizleri için gerekli parametrelerdir. Suda çözünürlüğü az olan bileşiklerin su-organik çözücü karışımında elde edilen pK_a verileri kullanılarak farklı metotlarla bileşiğin sudaki değerini hesaplamak mümkündür. Bu tez çalışmasında tetrasiklin, klortetrasiklin, oksitetrasiklin, 4-epitetrasiklin, 4-epiklortetrasiklin ve 4-epioksite-tetrasiklinin iyonlaşma sabitlerinin tayini %20, %25 ve %30 (h/h) asetonitril-su ortamlarında ters faz sıvı kromatografi yöntemi kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İyonlaşma sabitleri, izokratik ters faz sıvı kromatografik yöntem kullanılarak farklı derişimlerdeki asetonitril-su ikili karışımlarındaki alıkonma zamanı-pH ilişkisi incelenerek hesaplanmıştır. Hesaplamalarda LSER yaklaşımı kullanılmıştır. Deneysel olarak bulunan bu pK_a değerleri kullanılarak iki farklı yaklaşımla su ortamındaki pK_a değerleri hesaplanmıştır. Bu yöntemde bileşiklerin ve epimerlerinin tayininde bu teknik kullanılarak geliştirilmiş Kinetex F5 kolon (150x4,6 mm ID, 2,6 μ m) kullanılmıştır.

Çalışılan tetrasiklin grubu bileşikler ve epimerleri için C3' e bağlı olan OH grubuna ait pK_{a1} (konjuge trion sistem); C12' ye bağlı olan OH grubuna ait pK_{a2} (fenolik enon sistem) değerleri solver programıyla hesaplanmıştır (Çizelge 5.1)

Çizelge 5.1. Solver programı ile hesaplanan pKa₁ ve pKa₂ değerleri

Bileşikler	Asetonitril yüzdesi	pKa ₁	pKa ₂
Tetrasiklin	%20 (v/v)	4,069	7,233
	%25 (v/v)	4,237	7,287
	%30 (v/v)	4,462	7,359
4-epitetrasiklin	%20 (v/v)	4,693	7,104
	%25 (v/v)	4,738	7,257
	%30 (v/v)	4,802	7,374
Klortetrasiklin	%20 (v/v)	4,157	7,163
	%25 (v/v)	4,219	7,261
	%30 (v/v)	4,297	7,339
4-epiklortetrasiklin	%20 (v/v)	4,455	7,322
	%25 (v/v)	4,646	7,408
	%30 (v/v)	4,804	7,482
Oksitetrasiklin	%20 (v/v)	3,936	7,197
	%25 (v/v)	4,192	7,238
	%30 (v/v)	4,369	7,292
4-epioksite-tetrasiklin	%20 (v/v)	4,194	7,324
	%25 (v/v)	4,381	7,342
	%30 (v/v)	4,632	7,366

Mevcut çalışmada tetrasiklinin sudaki pK_a değerlerini tayin edebilmek için mol kesri ve solvatokromik çözücü parametresi olmak üzere iki farklı yaklaşım kullanılmıştır. Birinci yaklaşım, mol kesri-pK_a yaklaşımıdır. Bu ekstrapolasyon yöntemi kullanılarak, elde edilen lineer eşitliklerin kesim noktalarından su ortamındaki pK_a değerleri tayin edilmiştir (Çizelge 5.2). Diğer yaklaşımda, tetrasiklin için % 20, % 25 ve % 30 (v/v) asetonitril-su ikili karışımlarındaki solvatokromik çözücü parametresine karşı pKa₁ ve pKa₂ değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntılarda solvatokromik çözücü parametresi (x) yerine sudaki sabit değer olan 0,46 konularak su ortamındaki değerler belirlenmiştir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. Su ortamındaki pKa hesaplamaları

Bileşikler	Mol kesri yaklaşımı		Solvatokromik çözücü parametresi yaklaşımı	
	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a1}	pK _{a2}
Tetrasiklin	3,422	7,026	3,323	6,994
4-epitetrasiklin	4,472	6,570	4,485	6,604
Klortetrasiklin	3,874	6,814	3,892	6,836
4-epiklortetrasiklin	3,763	7,004	3,807	7,024
Oksitetrasiklin	3,083	7,005	3,138	7,017
4-epioksitetrasiklin	3,307	7,239	3,362	7,244

İki farklı yaklaşımla hesaplanan su ortamındaki pKa değerlerinin literatür değerleriyle uyumlu olduğu görülmektedir (Qiang ve Adams, 2004; Şanlı vd. 2009). Daha öncede belirtildiği gibi bu bileşiklerin epimerlerinin pKa değerlerine dair hiçbir veri literatürde mevcut değildir.

Deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen kapasite faktörü - pH ilişkisi incelenerek her bir bileşiğin kantitatif tayini için optimum koşul belirlenmiştir ve metot validasyonu çalışması yapılmıştır. Her bir bileşiğin kantitatif tayini için optimum koşulun belirlenmesinde gerekli olan şartların (kapasite faktörünün 1-10 arasında, seçicilik katsayısı (α) değerinin 1,15 ve üzerinde ayırma gücü (R_s değerinin 1,5 ve üzerinde) hangi koşulda sağlandığı belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntemin elde edilen parametreleri ışığında yöntemin uygulanabilir olduğu bulunmuştur. Bu yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla validasyon çalışmasında; doğrusalılık, duyarlılık, geri kazanım, tekrarlanabilirlik vb. parametreler incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır. Bu veriler ışığında tetrasiklin, klortetrasiklin ve oksitetrasiklinin atık su numunesindeki kantitatif tayini iç standart yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Literatür çalışmalarında bu grup bileşiklerin farklı numunelerindeki analizlerinde çoğunlukla Oasis HLB kartuş tercih edilmiştir. Yapılan atık su uygulamalarında ortalama geri kazanım yüzdeleri %40 ve üzerinde hesaplanmıştır.

Bu tez konusu üzerinde yapılan detaylı literatür taraması sonucunda tetrasiklin grubu bileşiklerin asetonitril ortamında ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle 1. iyonlaşma sabiti tayinine dair sadece bir çalışmaya rastlanmıştır. Bu bileşiklerin epimerlerinin iyonlaşma sabiti tayinine yönelik hiçbir çalışmaya rastlanmamıştır. Elde edilen bu veriler, ters faz sıvı kromatografisi yönteminde analitik prosedürün optimizasyonunda ve ilaçların çözünürlük, absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon gibi fizikokimyasal davranışları hakkında önemli bilgiler sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

- Akkan, A.G., 1997. Antibiyotiklerin Sınıflandırılmaları. Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, 2-3 Mayıs, İstanbul, 53-62.
- Amat, A., Fantacci, S., Angelis, F. D., Carlotti, B., Elisei, F., 2012. DFT/TDDFT Investigation of The Step Wise Deprotonation in Tetracycline: pK_a Assignment and UV-VIS Spectroscopy. Theoretical Chemistry Accounts. 131, 1218.
- Andrés, A., Rosés, M., Bosch, E., 2015. Prediction of the Chromatographic Retention of Acid-Base Compounds in pH Buffered Methanol-Water Mobile Phases in Gradient Mode by a Simplified Model. Journal of Chromatography A, 1385, 42-48.
- Avdeef, A., Box, K.J., Comer, J.E.A., Gilges, M., Hadley, M., Hibbert, C., Patterson, W., Tam, K.Y., 1999. pH Metric log P 11. pK_a Determination of Water Soluble Drugs in Organic Solvent- Water Mixtures. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 20, 631 - 641.
- Babić, S., Horvat, A.J.M., Pavlović, D.M., Kaštelan-Macan, M., 2007. Determination of pK_a Values of Active Pharmaceutical Ingredients. Trends in Analytical Chemistry, 26(11), 1043-1061.
- Barbosa, J., Barron, D., Cano, J., Jimenez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., Toro, I., 2001. Evaluation of Electrophoretic Method Versus Chromatographic, Potentiometric and Absorptiometric Methodologies for Determining $pK(a)$ Values of Quinolones in Hydroorganic Mixtures. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 24(5-6), 1087-1098.
- Beltran, J.L., Codony, R., Prat, M.D., 1993. Evaluation of Stability Constants from Multiwavelength Absorbance Data: Program STAR. Analytica Chimica Acta, 276, 441-454.
- Brunton, L.L., Lazo, J.S., Parker, K.L., 2009. Goodman & Gilman Tedavinin Farmakolojik Temelleri. Çev. Süzer, Ö. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.
- Cinquina, A. L., Longo, F., Anastasi, G., Giannetti, L., Cozzani, R., 2002. Validation of a highperformance liquid chromatography method for the determination of oxytetracycline, tetracycline, chlortetracycline and doxycycline in bovine milk and muscle. 987, 227-233.
- Cristofani, E., Antonini, C., Tovo, G., Fioroni, L., Piersanti, A., Galarini, R., 2008. A confirmatory method for the determination of tetracyclines in muscle using high-performance liquid chromatography with diode-array detection. 637, 40-46.

- Canbay, H.S., Demiralay, E.C., Alsancak, G., Ozkan, S.A., 2011. Chromatographic Determination of pK_a Values of Some Water-Insoluble Arylpropionic Acids and Arylacetic Acids In Acetonitrile–Water Media. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 56(5), 2071-2076.
- Demiralay, E.C., Alsancak, G., Ozkan, S.A., 2009. Determination of pK_a Values of Nonsteroidal Antiinflammatory Drug-Oxicams by RP–HPLC and Their Analysis in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of Separation Science*, 32(17), 2928-2936.
- Demiralay, E.C., Cubuk, B., Alsancak, G., Ozkan, S.A., 2010. Combined Effect of Polarity and pH On The Chromatographic Behaviour of Some Angiotensin II Receptor Antagonists and Optimization of Their Determination in Pharmaceutical Dosage Forms. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 53, 475-482.
- Demiralay, E.C., Koc D., Daldal Y.D., Cakır C., 2012. Determination Of Chromatographic And Spectrophotometric Dissociation Constants Of Some Beta Lactam Antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 71, 139– 143.
- Fibigr, J., Šatínský, D., Solich, P., 2017. A new approach to the rapid separation of isomeric compounds in a *Silybum marianum* extract using UHPLC core-shell column with F5 stationary phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 134, 203-213.
- Fritz, J. W., Zuo, Y., 2007. Simultaneous determination of tetracycline, oxytetracycline, and 4- epitetracycline in milk by high-performance liquid chromatography. *Food Chemistry*. 105, 1297-1301.
- Gajda A., Posyniak, A., 2009. Tetracyclines and their epimersa in animal tissues by high performance liquid chromatography. *Bull Vet Inst Pulawy*, 53, 263-267.
- Ghasemi, J. B., Jalalvand, A. R., 2011. Multi-wavelength spectrophotometric determination of the protolytic constants of tetracycline hydrochloride in some nonaqueous-water mixed solvents: A solvatochromism study. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 78, 277–286.
- Gündüz, T., 2010. Kimyacılar için istatistik. Gazi Kitapevi, 292p, Ankara.
- Harvey, D., 2000. Modern Analytical Chemistry. McGraw-Hill Companies, 816p, USA.
- Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., 1977. Liquid Chromatography of Ionogenic Substances with Nonpolar Stationary Phases. *Analytical Chemistry*, 49, 142-154.

- International Conference on Harmonization (ICH), 1996. Harmonised Tripartite Guideline Prepared Within The Third International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for The Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Text on Validation of Analytical Procedures. Erişim Tarihi: 06.11.2016.
<http://www.ifpma.org/ich1.html>.
- Iwaki, K., Okumura, N., Yamazaki, M., 1992. Determination of tetracycline antibiotics by reversed-phase high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. Journal of Chromatography A. 623, 153-158.
- Jing, T., Gao, Xiao-Dan., Wang, P., Wang, Y., Lin, Yan-Fei., Hu, Xiao-Zhong., Hao, Qiao-Lin., Zhou, Yi-Kai., Mei, Su-Rong., 2009. Determination of trace tetracycline antibiotics in foodstuffs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with selective molecular-imprinted solid-phase extraction. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 398, 2009-2018.
- Kayaalp, S.O., 2005. Rasyonel Tedavi Yönerinden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe Taş Kitapçılık, 198s, Ankara.
- Kazakevich, Y., Lofrutto, Y., 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. Wiley-Interscience, 1135p, Canada, USA.
- Koçak, E., Çelebier, M., Altınöz, S., 2013. Application of RP-HPLC for Determination of the Dissociation Constants of Rosuvastatin Calcium. Hacettepe University Journal of Faculty of Pharmacy, 32(2), 133-144.
- Miller, J., Miller, J., 2008. Analitik Kimyacılar için İstatistik ve Kemometri. Çev. Ahmet Uyanık, İlke Yayınevi, 312s, Ankara.
- Narasimham, L., Barhate, V.D., 2011. Physico-Chemical Characterization of Some Beta Blockers and Anti-Diabetic Drugs-Potentiometric and Spectrophotometric pK_a Determination in Different Co-Solvents. European Journal of Chemistry, 2(1), 36-46.
- Nikolaidou, K. I., Samanidou, V. F., Papadoyannis, I. N., 2008. Development and Validation of an HPLC Method for the Determination of Seven Tetracycline Antibiotics Residues in Chicken Muscle and Egg Yolk According to 2002/657/EC, 31, 2141-2158.
- NLREG Version 4.0. P.H, 2016. Sherrod. Erişim Tarihi: 20.11.2016
<http://www.sandh.com/Sherrod>.
- Poole, C.F. and Poole, S.K., 1991. Chromatography Today. Elsevier Science, 1026p, Amsterdam.

- Posyniak, A., Mitrowska, K., Zmudzki, J., Niedzielska, J., 2005. Analytical procedure for the determination of chlortetracycline and 4-epi-chlortetracycline in pig kidneys. *Journal of Chromatography A*, 1088, 169-174.
- Qiang, Z., Adams, C., 2004. Potentiometric Determination of Acid Dissociation Constants (pK_a) for Human and Veterinary Antibiotics. *Water Research*, 38, 2874–2890.
- Riley, C.M., Rosanske, T.W., 1996. Development and Validation of Analytical Methods. Elsevier Science Ltd., 352, New York.
- Rosés, M., Bosch, E., 2002. Influence of Mobile Phase Acid–Base Equilibria on The Chromatographic Behaviour of Protolytic Compounds. *Journal of Chromatography A*, 982, 1–30.
- Rosésa, M., Bollietb, D., Pooleb, C.F., 1998. Comparison of solute descriptors for predicting retention of ionic compounds (phenols) in reversed-phase liquid chromatography using the solvation parameter model. *Journal of Chromatography A*, 829, 29-40.
- Sanli, S., Sanli, N., Alsancak, G., 2009. Determination of Protonation Constants of Some Tetracycline Antibiotics by Potentiometry and LC Methods in Water and Acetonitrile- Water Binary Mixtures. *Journal of Brazillian Chemical Society*, 20, 939-946.
- Shedlovsky, T., 1962. The behavior of carboxylic acids in mixed solvents. Pesce B. (Ed), *Electrolytes* (146-151), Pergamon Press, 455p, NewYork.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2011. *Analitik Kimya Temel İlkeler*. Çev. Kılıç, E., Yılmaz, H., Bilim Yayınları, 1051s, Ankara.
- Shi, J.Z., Hu, H.Y., Shen, Y.Y., Xu, J.J., Shi, M.L., Jin R.C., 2017. Long-term Effects of Oxytetracycline (OTC) on the Granule-Based Anammox: Process Performance and Occurrence of Antibiotic Resistance Genes. *Biochemical Engineering Journal*, 127, 110-118.
- Takács-Novák, K., Box, K.S., Avdeef, A., 1997. Potentiometric pK_a Determination of Water-Insoluble Compounds. Validation Study in Methanol/Water Mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, 151, 235-248.
- Talay, A., Demiralay, E.Ç., Daldal, Y.D., Üstün, Z., 2015. Investigation of Thermodynamic Acidity Constants of Some Statins with RPLC Method. *Journal of Molecular Liquids*, 208, 286-290.
- Üstün, Z., Talay, A., Demiralay, E.Ç., 2016. Optimization of RPLC Conditions for Quantitative Analysis of Atorvastatin and Rosuvastatin in Pharmaceutical Dosage Form. *SDÜ Fen Dergisi*, 11(1).

- Wang, L. F., Peng, J. D., Liu, L. M., 2008. A reversed-phase high performance liquid chromatography coupled with resonance Rayleigh scattering detection for the determination of four tetracycline antibiotics. 630, 101-106.
- Yasuda, M., 1959. Dissociation Constants of Some Carboxylic Acids in Mixed Aqueous Solvents. Bulletin of the Chemical Society of Japan, 32, 429-432.
- Yavuz O., Aksoy A., 2006. Örnek Hazırlamada Katı Faz Ekstraksiyon Metodu. F.Ü. Sağlık Bil. Dergisi, 20(3), 259-269.
- Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S., 1997. Enstrümental Analiz Yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, A64, 506s, Ankara.
- Yu, H., Chen, S., Cao, P., 2012. Synergistic Bactericidal Effects and Mechanisms of Low Intensity Ultrasound and Antibiotics Against Bacteria: A Review. Ultrasonics Sonochemistry, 19, 377-382.
- Yu, H., Tao, Y., Chen, D., Wang, Y., Yuan, Z., 2011. Development of an HPLC-UV Method for the Simultaneous Determination of Tetracyclines in Muscle and Liver of Porcine, Chicken and Bovine with Accelerated Solvent Extraction. Food Chemistry, 124, 1131-1138.
- Zheng, W.L., Zhang, L.F., Zhang, K.Y., Wang, X.Y., Xue, F.Q., 2012. Determination of Tetracyclines and Their Epimers in Agricultural Soil Fertilized with Swine Manure by Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. Journal of Integrative Agriculture, 11(7), 1189-11.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : İlkey KONÇE

Doğum Yeri ve Yılı : İstanbul, 1989

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : ilkaykonce@hotmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Isparta Şehit Ali İhsan Kalmaz Anadolu Lisesi, 2007

Lisans : SDÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü